

Die Regulation von *Preadipocyte factor-1* bei Gestationsdiabetes mellitus und Präeklampsie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Ulrike Wurst

geboren am 12.05.1990 in Schmalkalden

angefertigt an der:

Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie

Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. habil. Mathias Faßhauer

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 14.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1. Bibliographische Beschreibung.....	3
2. Einführung in die Thematik	4
2.1. Adipositas und Adipokine	4
2.2. GDM und PE	6
2.3. Adipokine bei GDM und PE	8
2.4. <i>Preadipocyte Factor-1</i> als neues Adipokin	10
3. Untersuchungen und Ergebnisse im Rahmen der Dissertation	13
3.1. Studienpopulation 1: GDM	13
3.2. Studienpopulation 2: PE	14
3.3. Studienpopulation 3: Pref-1 im peripartalen Zeitraum und der humanen Plazenta	15
4. Publikation	16
4.1. Serum levels of the adipokine Pref-1 in gestational diabetes mellitus	16
4.2. The adipokine preadipocyte factor-1 is downregulated in preeclampsia and expressed in placenta.....	21
4.3. Nachweis über die Anteile der Co-Autoren	28
5. Zusammenfassung	31
6. Literaturverzeichnis.....	34
A. Abkürzungsverzeichnis	41
B. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	42
C. Erklärung über die Vorbehaltlichkeit der Verfahrenseröffnung zur Verleihung des Titels Dr. med.....	43
D. Wissenschaftlicher Lebenslauf.....	44
E. Danksagung	46

1. Bibliographische Beschreibung

Ulrike Wurst

Die Regulation von *Preadipocyte factor-1* bei Gestationsdiabetes mellitus und Präeklampsie

Universität Leipzig, Dissertation

46 Seiten, 100 Literaturstellen, 1 Abbildung, 5 Anlagen

Referat:

Adipositas und die damit verbundenen Begleiterkrankungen zeigen einen deutlichen Anstieg der Prävalenz in der Bevölkerung. Auch für die Schwangerschaft gilt starkes Übergewicht als Risikofaktor für metabolische und vaskuläre Komplikationen wie Gestationsdiabetes mellitus (GDM) und Präeklampsie (PE). In den letzten 20 Jahren wurde eindrücklich nachgewiesen, dass eine Dysregulation von Fettzell-sezernierten Proteinen, sogenannten Adipokinen, ursächlich zu GDM und PE beitragen könnte. Zu Beginn der Dissertation lagen jedoch nur unzureichende Daten über die Regulation des Insulinresistenz-induzierenden, anti-adipogenen und anti-angiogenen Adipokins *Preadipocyte factor-1* (Pref-1) bei GDM und PE vor. Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Regulation von zirkulierendem Pref-1 bei GDM und PE sowie seine Expression in der Plazenta. Bei 74 Patientinnen mit GDM konnte kein signifikanter Unterschied der Pref-1 Konzentrationen ($0.40 \mu\text{g/l}$) verglichen zu 74 Gesunden ($0.42 \mu\text{g/l}$) ($p = 0.655$) festgestellt werden (Wurst U et al., Cytokine 2015; 71: 161–164). Es zeigte sich in der Kohorte eine unabhängige Assoziation zwischen Pref-1 und Schwangerschaftsalter bei der Blutentnahme, Triglyzeriden, Kreatinin, *Body Mass Index* und C reaktivem Protein ($p < 0.05$). In einer Studienkohorte von 51 Schwangeren mit PE wurden signifikant niedrigere Serumspiegel von Pref-1 ($0.49 \mu\text{g/l}$) im Vergleich zu 51 gesunden Schwangeren ($0.68 \mu\text{g/l}$) ($p < 0.001$) gemessen (Schrey S, Wurst U, et al., Cytokine 2015; 75: 338–343). In der multiplen Regressionsanalyse waren PE, Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie zirkulierendes Leptin unabhängige Prädiktoren für Pref-1. Im peripartalen Zeitraum zeigte sich ein akuter und deutlicher Abfall von zirkulierendem Pref-1 im mütterlichen Blut und das Adipokin wurde immunhistochemisch im Plazentagewebe nachgewiesen. Die Daten dieser Studien sind vereinbar mit den Hypothesen, dass Pref-1 mit fortschreitender Schwangerschaft zunehmend produziert wird, die Plazenta zur Sekretion des Adipokins aktiv beiträgt sowie das Adipokin bei PE dysreguliert ist. Weiterführende Untersuchungen im Tiermodell sowie prospektive Studien sind notwendig, um die Signifikanz von Pref-1 bei GDM und PE näher zu untersuchen.

2. Einführung in die Thematik

2.1. Adipositas und Adipokine

In der Bundesrepublik Deutschland galten im Jahr 2010 18% der erwachsenen Bevölkerung als adipös, beziehungsweise „fettleibig“ [1]. In den Vereinigten Staaten von Amerika stieg diese Zahl bis 2012 auf bereits 34,9% [2]. Die Einteilung des Schweregrades des Übergewichtes erfolgt anhand des *body mass index* (BMI), welcher aus Körpergewicht und Körpergröße ermittelt wird. Adipositas ist definiert als ein BMI von $>30 \text{ kg/m}^2$. Vor allem durch die mit Übergewicht assoziierten Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM), arterielle Hypertonie und Atherosklerose [3] stellt diese Problematik das heutige Gesundheitssystem weltweit vor eine enorme Herausforderung. In den letzten Jahren hat sich ein Krankheitsbild etabliert, welches Adipositas und die damit verbundenen Krankheiten verbindet, das sogenannte Metabolische Syndrom. Zu den Merkmalen dieses Erkrankungsbildes gehören neben erhöhtem Körpergewicht auch Dyslipidämie, Insulinresistenz und Bluthochdruck [4].

Durch den steigenden gesellschaftlichen Fokus auf die Adipositas, widmete sich auch die Forschungsgemeinschaft zunehmend dem Fettgewebe und dessen Eigenschaften. So wurde in den letzten 20 Jahren das Fettgewebe nicht mehr als bloßer Energiespeicher, sondern mehr und mehr als hormonell aktives Organ definiert, welches großen Einfluss auf andere Organe und Funktionen des menschlichen Körpers nimmt [5]. Interessanterweise zeigt hierbei nicht nur der Zustand der Adipositas, also der Überschuss an Fettgewebe, sondern auch dessen Mangel, wie zum Beispiel bei der Lipodystrophie, einen engen Zusammenhang zum Metabolischen Syndrom [6]. Insbesondere das abdominale Fettgewebe, welches sich um die Organe des Verdauungstraktes konzentriert, weist eine hohe metabolische und endokrine Aktivität auf und wird dadurch mit Insulinresistenz, Dyslipidämie, Bluthochdruck und Hyperglykämie in Verbindung gebracht [7].

Unterstützt wurden diese Ergebnisse 1994 mit der Entdeckung von Leptin [8]. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein von den Zellen des Fettgewebes in die Blutbahn sezerniert wird und über mehrere spezifische Rezeptoren direkt den Energie-, Zucker- und Lipidhaushalt beeinflusst [9]. Über verschiedene Signalkaskaden senkt Leptin die Nahrungsaufnahme und erhöht den Energieverbrauch und die Insulinsensitivität [10]. Bei Menschen mit Adipositas sind die Konzentrationen an zirkulierendem Leptin durch eine Leptinresistenz bedingt paradox erhöht [11].

Der Entdeckung von Leptin folgte in den letzten Jahren der Nachweis weiterer von Fettzellen sezernierten Signalstoffe, sogenannter Adipokine oder Adipozytokine. Diese nehmen Einfluss auf den Zucker- und Lipidhaushalt, das Immunsystem, die Blutdruckregulation und Entzündungsvorgänge [12]. Dauerhafte Adipositas führt zu einer chronischen lokalen Entzündungsreaktion des Fettgewebes. Dabei werden lokale Entzündungsmediatoren ausgeschüttet, was zu einem Anstieg von systemischen Entzündungsparametern führt [13]. Dadurch entstehende Hypertrophie und Hyperplasie des Fettgewebes bedingen wiederum ein Ungleichgewicht in der Ausschüttung verschiedener protektiver und pro-inflammatorischer Adipokine. Es entsteht in der Folge ein erhöhtes Risiko für Insulinresistenz und kardiovaskuläre Erkrankungen [14]. Adipokine bilden somit ein Verbindungsglied zwischen Adipositas und den damit verbundenen Folgeerkrankungen.

In den nächsten Abschnitten werden exemplarisch Adiponectin, als protektives Adipokin, sowie die entzündungsfördernden Adipokine Resistin und Chemerin näher beschrieben.

Adiponectin ist ein Adipokin, welches fast ausschließlich von Zellen des Fettgewebes sezerniert wird [15]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Adipokinen weist es eine negative Korrelation zur Fettmasse auf. Bei adipösen Patienten werden folglich niedrige Serumspiegel von Adiponectin gemessen, während bei normalgewichtigen Menschen hohe Konzentrationen nachgewiesen werden können [16,17]. Über verschiedene Rezeptoren in Muskulatur und Leber erhöht Adiponectin die Insulinsensitivität und senkt die Glukoneogenese [18]. Dies wird durch zahlreiche klinische Untersuchungen unterstützt, in denen sich niedrige Serumkonzentrationen von Adiponectin als unabhängiger Risikofaktor für T2DM präsentierten [19]. Adiponectin hat zudem anti-inflammatorische Eigenschaften. Über Suppression entzündlich wirkender Mediatoren wie *tumor necrosis factor* (TNF)- α und Interleukin (IL)-6 sowie Förderung anti-entzündlicher Faktoren wie IL-10 wirkt es einer Inflammation entgegen [20,21]. Zusätzlich beeinflusst Adiponectin Entzündungsprozesse im Endothel. Es verhindert die Invasion von Immunzellen in das Gewebe und wirkt dadurch anti-atherosklerotisch [22,23]. Hohe Spiegel von Adiponectin gehen folglich mit einem niedrigeren Risiko für koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt einher [24]. In Zusammenschau der Ergebnisse präsentiert sich Adiponectin als protektiv wirkendes Adipokin. Es wirkt anti-entzündlich und anti-atherosklerotisch, und nimmt über seine Insulinsensitivierenden Eigenschaften positiven Einfluss auf den Energiestoffwechsel.

Resistin wird als Adipokin neben Adipozyten auch von Monozyten und Makrophagen sezerniert. Vor allem abdominales Fettgewebe konnte als Ort der Sekretion identifiziert

werden [25]. Unterstützend zu diesen Ergebnissen wurden in klinischen Studien erhöhte Konzentrationen von Resistin bei stark übergewichtigen Menschen gemessen [26]. Über Stimulation pro-inflammatorischer Mediatoren und einen positiven *Feedback*-Mechanismus spielt Resistin auch bei der Entstehung von Entzündungsvorgängen eine tragende Rolle [27]. Tierexperimente zeigen, dass erhöhte Resistinkonzentrationen positiv mit Adipositas, erhöhtem Blutzucker und Insulinresistenz korrelieren [26,28]. Resistin stellt somit ein potentielles Verbindungsglied zwischen zentraler Adipositas und der Entstehung von Insulinresistenz dar.

Chemerin wird ebenfalls von Adipozyten sezerniert und nimmt bedeutenden Einfluss auf deren Differenzierung und Metabolismus [29]. Einen pro-inflammatorischen Effekt erlangt es vor allem durch seine Wirkung als Chemokin, welches Makrophagen und dendritische Zellen anlockt und somit eine Entzündungsreaktion des Gewebes begünstigt [30]. In klinische Studien ist Chemerin mit Markern für Entzündung sowie Facetten des Metabolischen Syndroms und der Blutdruckregulation assoziiert [31,32]. Chemerin spielt somit vermutlich eine tragende Rolle in der Entstehung von Adipositas, Entzündung und damit assoziierten Erkrankungen.

2.2. GDM und PE

In der Schwangerschaft stellen Adipositas und damit assoziierte Begleiterkrankungen ein besonderes Risiko dar. Erhöhtes Körpergewicht, Insulinresistenz oder Dyslipidämie, steigern für Frauen die Gefahr an Schwangerschaftskomplikationen zu leiden. GDM und PE stellen zwei schwere metabolische und vaskuläre Schwangerschaftskomplikationen dar, die das Risiko für spätere metabolische und vaskuläre Erkrankungen bei Mutter und Neugeborenem erheblich erhöhen. Mit zunehmenden Erkrankungszahlen von Adipositas und steigendem Alter der Mütter, zeigen auch GDM und PE deutliche Anstiege in Prävalenz und Inzidenz. Der Anteil der Schwangeren mit GDM in Deutschland stieg im Jahr 2012 auf 4,3% [33], während er zwischen den Jahren 2001-2006 noch bei 1,9% lag [34].

GDM ist charakterisiert durch eine gestörte Glucosetoleranz mit Beginn oder Erstmanifestation während der Schwangerschaft und führt zu akuten und chronischen Komplikationen bei Mutter und Neugeborenem [35]. Retrospektive und prospektive Studien konnten einige Risikofaktoren für die Erkrankung aufzeigen. Mütterliches Übergewicht, das Alter der Mutter während der Schwangerschaft, familiäre Vorbelastung mit Diabetes mellitus, Zugehörigkeit zu einer bestimmten ethnischen Gruppe, psychologische Störungen, wie zum

Beispiel Depression und auch Anwendung von Techniken der Reproduktionsmedizin können die Wahrscheinlichkeit einer GDM-Schwangerschaft erhöhen [36]. Obwohl sich die Glucoseintoleranz nach der Entbindung meist zurückbildet, verbleibt für Patientinnen mit GDM in der Anamnese ein deutlich erhöhtes Risiko von 17-50% später an T2DM [37] oder anderen chronischen vaskulären Komplikationen zu erkranken [38]. Auch für das Neugeborene entstehen durch GDM Risiken und erhöhte perinatale Morbidität. Insbesondere Hypoglykämie, Ikterus und erhöhtes Geburtsgewicht sind hier als mögliche Komplikationen zu erwähnen [35]. Ebenso besteht wie bei der Mutter nach einer GDM-Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für das Neugeborene, später an einem T2DM zu erkranken.

Immer noch eine führende Rolle bei maternaler und fetaler Morbidität und Mortalität spielt die PE. Sie stellt eine schwere multisystemische Komplikation der Schwangerschaft dar. Neu auftretender Bluthochdruck sowie Proteinurie während der zweiten Schwangerschaftshälfte sind die hauptsächlichen Charakteristika der Erkrankung [39]. Obwohl die Pathogenese der PE bisher noch nicht vollständig geklärt ist, wird eine Dysbalance zwischen angiogenen und anti-angiogenen Faktoren als potentielle Ursache angesehen [40–43]. Bereits vor Beginn der klinischen Symptome der PE spielen plazentare Funktionsstörungen eine Rolle in der Pathophysiologie. *Remodelling* der Gefäße und gestörte Invasion von Trophoblasten in das Organ führen zu verminderter Blutzirkulation und Wachstumsretardierung der Plazenta [44]. Dadurch entstehender oxidativer Stress stimuliert die Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren wie $\text{TNF-}\alpha$ und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sowie des anti-angiogen wirkenden löslichen VEGF-Rezeptors *soluble fms-like tyrosine kinase* (sFLT)-1 [45]. Die Folge ist eine maternale systemische Entzündungsreaktion. Kennzeichnend hierfür sind Leukozytenerhöhung, Aktivierung von Komplementfaktoren und des Gerinnungssystems [46]. Studien konnten belegen, dass diese systemische Reaktion zu verringerter plazerarer Perfusion und gesteigerter vaskulärer Reaktivität führt, welche bereits dem klinischen Beginn der Erkrankung vorausgehen [47].

Nach der Entbindung normalisiert sich bei den meisten Frauen mit GDM und PE der Glucosehaushalt beziehungsweise der Blutdruck wieder. Trotz dieser Normalisierung verbleibt dennoch für Mutter und Neugeborenes ein stark erhöhtes Risiko für metabolische oder vaskuläre Erkrankungen in der Zukunft. So beträgt das Risiko innerhalb von 8 Jahren nach einer GDM-Schwangerschaft an T2DM zu erkranken ca. 50% [48]. Für Frauen mit PE besteht ein 2fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines späteren T2DM oder einer koronaren Herzerkrankung [49,50].

2.3. Adipokine bei GDM und PE

Die genaue Ursache der Entstehung von GDM und PE ist bisher nicht vollständig geklärt. In zahlreichen Untersuchungen wurden jedoch Adipositas und Facetten des Metabolischen Syndroms als Risikofaktoren der beiden Schwangerschaftskomplikationen identifiziert [51–54]. Chronische systemische Entzündung und die damit verbundene Ausschüttung von zirkulierenden Mediatoren sind eng mit den Pathomechanismen hinter GDM und PE verbunden. Adipokine und ihre Wirkung stellen somit möglicherweise eine Verbindung zwischen Adipositas und der Entstehung der Erkrankungen dar. Im folgenden Abschnitt werden publizierte Daten zur Regulation der oben beschriebenen Adipokine Leptin, Adiponectin, Resistin und Chemerin bei GDM und PE dargestellt.

Die Schwangerschaft gilt als **Leptin**-resistenter Zustand, in dem zirkulierendes Leptin im Vergleich zu nichtschwangeren Frauen zwei- bis dreifach erhöht ist [55]. Ebenso wurden sowohl Leptin als auch Leptin-Rezeptoren in humanem Plazentagewebe identifiziert [56]. Bei Schwangeren mit GDM werden erhöhte Konzentrationen an Leptin gemessen [57]. Erhöhtes Leptin in der frühen Schwangerschaft stellt sich zudem als unabhängiger Prädiktor für ein erhöhtes GDM-Risiko im Schwangerschaftsverlauf dar [58]. Die chronische subklinische Entzündung sowie erhöhte Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6, führen zu Insulinresistenz und tragen zum Krankheitsbild GDM bei [59]. Dieser chronisch-entzündliche Zustand und die Ausschüttung der entzündungsfördernden Signalstoffe führen wiederum zu verstärkter Leptin-Produktion. Da Leptin selbst ebenfalls die Produktion von TNF- α und IL-6 verstärkt, entsteht so ein „Teufelskreis“ im Sinne einer positiven Rückkopplung, der die Entzündungsreaktion chronisch unterhält [18]. Da Insulin die Leptin-Sekretion von Adipozyten erhöht, führt womöglich auch die bei GDM vorliegende Hyperinsulinämie zu vermehrter Ausschüttung von Leptin [60]. Auch in Schwangerschaften mit PE werden erhöhte Konzentrationen von zirkulierendem sowie placentarem Leptin gemessen [61,62]. Da diese bereits vor dem Eintreten von Symptomen nachweisbar sind, gelten erhöhte Leptin-Spiegel als Risikofaktor für eine spätere PE [63]. Tiermodelle und *in-vitro* Experimente legen die für PE typische verminderte placentare Durchblutung sowie die dadurch resultierende Hypoxie als ursächlich für die erhöhten Konzentrationen nahe [64,65]. Auch kompensatorische Mechanismen, in denen erhöhtes Leptin die Versorgung der Plazenta mit Nährstoffen und das Wachstum von Gefäßen verbessert, tragen wahrscheinlich zur Hochregulation des Adipokins bei PE bei [66].

Die zirkulierenden **Adiponectin**-Spiegel nehmen mit Verlauf der Schwangerschaft zunehmend ab, während Konzentrationen des Adipokins im Nabelschnurblut kontinuierlich ansteigen [67,68]. Im Vergleich zu gesunden Schwangeren werden bei Frauen mit GDM niedrigere Adiponectin-Konzentrationen gemessen [69]. Ebenso zeigt sich eine Herabregulation der Expression von Adiponectin in Plazentagewebe bei GDM-Schwangerschaften [70]. Auch Feten von Müttern mit GDM weisen niedrigere Adiponectin-Konzentrationen auf als Feten einer normalen Schwangerschaft bei gleichem Gestationsalter und Geburtsgewicht [71]. Die Herabregulation von Adiponectin im ersten Trimenon der Schwangerschaft gilt zudem als unabhängiger Prädiktor für die Entwicklung eines GDM [72]. Eine mögliche Ursache liegt in der für GDM typischen Entzündungsreaktion im Organismus, verbunden mit der Ausschüttung systemischer pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6. Beide haben einen negativen regulatorischen Effekt auf Adiponectin und vermindern somit dessen Expression und zirkulierenden Spiegel [73]. Da Adiponectin Insulin-sensitivierende Eigenschaften besitzt, gehen niedrige Serumkonzentrationen des Adipokins mit einer Verschlechterung der Insulinsensitivität einher. Hohe Insulinspiegel, wie sie bei GDM bestehen, unterdrücken hingegen die Adiponectin-Sekretion und können damit ebenfalls zu erniedrigten Serumkonzentrationen beitragen [73]. Bei PE bestehen im Gegensatz zu GDM erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem Adiponectin [74]. Andere Ergebnisse zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied von Adiponectin zwischen PE und normalen Schwangerschaften [62]. Die Insulin-sensitivierenden Eigenschaften sowie positive Effekte des Adipokins auf die Gefäßfunktion haben potentiell einen abmildernden Einfluss auf die bei PE herrschenden Entzündungsvorgänge im Organismus.

Resistin wird neben Adipozyten und Makrophagen auch von der humanen Plazenta exprimiert. Damit übereinstimmend lassen sich signifikant höhere zirkulierende Serumkonzentrationen bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nichtschwangeren sowie ein Anstieg der Konzentrationen mit zunehmendem Schwangerschaftsalter messen [75]. Die Studienlage über Resistin-Spiegel bei GDM ist jedoch uneindeutig. Während in einigen Untersuchungen signifikant höhere Werte gemessen werden [76], zeigen sich in anderen keine Unterschiede beziehungsweise sogar niedrigere Konzentrationen bei GDM im Vergleich zu einer gesunden Schwangerschaft [71,77]. Auch für PE liegen kontroverse Ergebnisse zu Resistin-Konzentrationen vor. Erhöhten Konzentrationen einerseits [62], stehen erniedrigte Serumspiegel auf der anderen Seite entgegen [71]. Da Resistin-Werte abhängig von der renalen Filtration sind, könnte die bei PE beeinträchtigte Nierenfunktion zu erhöhten zirkulierenden Konzentrationen beitragen [78].

Chemerin-Konzentrationen sind zum Beginn der Schwangerschaft noch niedriger als bei nichtschwangeren Frauen, steigen jedoch mit dem Schwangerschaftsverlauf im mütterlichen Blut an [79]. Außerdem besteht eine positive Korrelation von Chemerin mit dem BMI und Insulinresistenz bei gesunden Schwangeren [80]. Im Gegensatz dazu sind hohe Chemerin-Spiegel mit niedrigeren Adiponectin-Konzentrationen assoziiert [79]. Mehrere klinische Untersuchungen zeigen bisher keinen signifikanten Unterschied von zirkulierendem Chemerin bei GDM im Vergleich zu gesunden Schwangeren [81,82]. Eine weitere Studie bestätigt diese Ergebnisse, konnte allerdings einen starken positiven Zusammenhang zwischen Chemerin-Konzentrationen und Parametern für Insulinresistenz sowie der Nierenfunktion aufzeigen [83]. Bei Schwangeren mit PE werden signifikant höhere Chemerin-Spiegel gemessen als bei gesunden Schwangeren [84]. Interessanterweise blieb dieser Effekt auch mehrere Monate nach der Entbindung bestehen [84]. Hohes zirkulierendes Chemerin korreliert positiv mit dem Schweregrad der PE [85]. Erhöhte Blutdruckwerte sowie schlechtere Nierenfunktion bei Frauen mit PE gehen daher mit höheren Chemerin-Konzentrationen einher [85].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Schwangerschaftskomplikationen GDM und PE durch ein Ungleichgewicht protektiver und pro-inflammatorischer Faktoren begünstigt werden. Dieses Ungleichgewicht führt zu einer Dysregulation metabolischer und vaskulärer Vorgänge im Organismus, die zum klinischen Bild der beiden Erkrankungen beitragen. Dabei spielen auch Adipokine eine wichtige Rolle. Unklar bleibt bisher jedoch, ob Adipokine somit direkt zur Pathophysiologie der Schwangerschaftskomplikationen beitragen oder sich als klinischer Marker für beide Krankheitsbilder eignen.

2.4. Preadipocyte Factor-1 als neues Adipokin

Preadipocyte Factor-1 (Pref-1), auch *Delta like* (DLK) 1-Homolog oder *Fetal Antigen-1*, gehört zur Familie der *Epidermal Growth Factor*-like Proteine [86] und wurde kürzlich als neues Adipokin eingeführt. Über extrazelluläre Signalkaskaden nimmt es vor allem Einfluss auf die Adipogenese [87], aber auch auf Reifungsprozesse in Knochen und Knorpel [88]. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Adipokinen wird Pref-1 nicht vorrangig von reifen Fettzellen, sondern viel mehr von deren unreifen Vorläuferzellen, den Präadipozyten, in hohen Konzentrationen sezerniert. Zunehmende Differenzierung zu reifen Adipozyten wird hingegen mit sinkenden Pref-1-Spiegeln assoziiert [86]. Über verschiedene Signalkaskaden, unter anderem der Induktion von Sox9, wird durch hohe Konzentrationen von Pref-1 die Adipogenese verhindert [89]. Pref-1 könnte also vor allem in der Entstehung der Adipositas

eine wichtige Rolle spielen. Bei fehlender Expression von Pref-1 zeigen sich Wachstumsretardierung, signifikant erhöhte Fettmasse und Hyperlipidämie im Tiermodell [90]. Umgekehrt führt eine Überexpression von Pref-1 zu reduzierter Fettmasse, aber auch zu verminderter Glucosetoleranz, erhöhter Insulinresistenz und Hypertriglyzeridämie [91]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Tierexperimenten wurde auch in klinischen Untersuchungen eine positive Korrelation von Pref-1 mit erhöhten Blutfettwerten, erhöhtem Blutzucker sowie Insulinresistenz gezeigt [92,93]. Interessanterweise gehen hohe Pref-1-Konzentrationen mit verminderter Sekretion anderer Adipokine wie Leptin, Adiponectin oder Resistin, einher [94]. Da sowohl das Fettgewebe als auch die von Adipozyten sezernierten Adipokine eng mit dem Zucker- und Lipidhaushalt verbunden sind, nimmt Pref-1 nicht nur direkten Einfluss auf die Adipogenese, sondern könnte damit indirekt zur Entstehung metabolischer Erkrankungen beitragen.

Pref-1 spielt auch eine pro-inflammatorische Rolle. So induziert es die Gen- und Proteinexpression verschiedener entzündungsfördernder Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, *Monocyte Chemoattractant Protein-1* und IL-6 in Monozyten und Adipozyten *in vitro* [95]. Über Stimulation von *Nuclear Factor* κ (NF κ)-B führt Pref-1 zusätzlich zur Ausschüttung systemisch wirkender pro-inflammatorischer Mediatoren auch zu einer Proliferation von Immunzellen [96], welche die Entzündungsreaktion weiter begünstigen.

Neben seinen anti-adipogenen, pro-inflammatorischen und Insulinresistenz-induzierenden Effekten weist Pref-1 auch potentielle anti-angiogene Eigenschaften auf. So verhindert das Adipokin über Antagonisierung des NOTCH-Signalweges die Neubildung von Gefäßen und verzögert die Wundheilung [97].

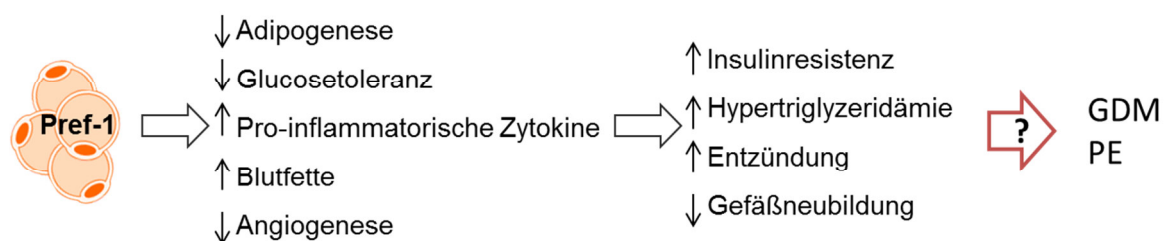


Abbildung 1 Wirkung von Pref-1 auf den Organismus und potentieller Zusammenhang zu GDM und PE

Zusammenfassend könnte Pref-1 über seine anti-adipogenen, pro-inflammatorischen, Insulinresistenz-induzierenden und anti-angiogenen Effekte eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von GDM und PE spielen. Zu Beginn der Dissertation lagen jedoch keine Daten zu maternalen Spiegeln des Adipokins bei diesen Schwangerschaftskomplikationen

vor. Aus diesem Grund untersucht die vorliegende Arbeit die Regulation von Pref-1 bei drei Studienpopulationen:

- 1) In Studienpopulation 1 (GDM) wurde Pref-1 bei 74 Probandinnen mit GDM und 74 gesunden Alter-, BMI- und Gestationsalter-gematchten Schwangeren quantifiziert.
- 2) In Studienpopulation 2 (PE) wurden zirkulierende Konzentrationen von Pref-1 bei 51 Patientinnen mit PE, sowie 51 gesunden Alter-gematchten Probandinnen untersucht. Außerdem wurden in einer Subkohorte die Serumspiegel 6 Monate postpartal quantifiziert.
- 3) In Studienpopulation 3 (peripartaler Zeitraum) wurden Pref-1 Serumkonzentrationen bei 40 gesunden Schwangeren innerhalb von 24 h vor und nach elektiver Sectio gemessen.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Plazenta zur Regulation von Pref-1 in der Schwangerschaft beiträgt. Dafür wurden Plazentagewebeproben entnommen und immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich wurde Nabelschnurblut gewonnen und die Pref-1 Konzentrationen gemessen.

Folgende Hypothesen wurden überprüft:

- 1) Maternale Pref-1 Konzentrationen sind bei den Schwangerschaftskomplikationen GDM und PE im Vergleich zu gesunden Schwangeren erhöht.
- 2) Die Plazenta trägt durch Expression von Pref-1 zur Regulation des Adipokins in der Schwangerschaft bei.

3. Untersuchungen und Ergebnisse im Rahmen der Dissertation

Im Rahmen der Dissertation wurden Untersuchungen in drei humanen Studienpopulationen durchgeführt (Studienpopulation 1: Patientinnen mit GDM, Studienpopulation 2: Patientinnen mit PE und Studienpopulation 3: gesunde Schwangere im peripartalen Zeitraum). Die Rekrutierung der Patientinnen erfolgte in der Abteilung für Geburtsmedizin sowie der Klinik für Endokrinologie und Nephrologie des Universitätsklinikums Leipzig. Labormedizinische Messungen in den entnommenen Nüchternblutentnahmen wurden durch das Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Leipzig durchgeführt. In allen Studienpopulationen erfolgte die Korrelation von Pref-1-Serumkonzentrationen mit klinischen und biochemischen Markern für Glucose- und Lipidstoffwechsel, Nierenfunktions- sowie Inflammation. Serumkonzentrationen der Adipokine Pref-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Leptin (Mediagnost, Reutlingen) und Adiponectin (Mediagnost, Reutlingen) wurden in allen Nüchternblutproben mittels kommerziell erhältlicher *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISAs) nach Vorgaben des Herstellers quantifiziert. Keine der Patientinnen befand sich zum Zeitpunkt der Nüchternblutentnahme in den Wehen. Für alle statistischen Analysen wurde SPSS Software 20.0 (IBM, Armonk, USA) verwendet.

Die Studien wurden von der lokalen Ethikkommission genehmigt und alle Teilnehmerinnen unterzeichneten vor Beginn der Untersuchungen eine Aufklärungs- und Einverständniserklärung.

3.1. Studienpopulation 1: GDM

In Studienpopulation 1 wurde zirkulierendes Pref-1 bei Patientinnen mit GDM untersucht. Hierfür wurden 74 schwangere Frauen mit GDM sowie 74 gesunde Alter-, BMI- und Gestationsalter-gematchte Kontrollschwangerschaften in die Studie eingeschlossen. Die Definition des GDM erfolgte nach den Kriterien der *American Diabetes Association* als eine oder mehrere erhöhte Plasma-Glucosekonzentrationen während eines zweistündigen oralen 75g-Glucosetoleranztestes. Hierbei wurden folgende Schwellenwerte verwendet: nüchtern ≥ 5.1 mmol/l; 1 h ≥ 10.0 mmol/l; 2 h ≥ 8.5 mmol/l [98]. Vorbestehender Diabetes mellitus, chronische oder generalisierte Entzündungen, immunsuppressive Behandlung und/oder Endstadium einer malignen Erkrankung waren Ausschlusskriterien.

In Studienpopulation 1 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der mittleren zirkulierenden Pref-1 Serumkonzentrationen zwischen Patientinnen mit GDM (0.40 µg/l) und

gesunden für Alter-, BMI- und Gestationsalter gematchten Kontrollen (0.42 µg/l) ($p = 0.655$). In der univariaten Korrelationsanalyse der gesamten Studienpopulation waren Pref-1-Serumkonzentrationen positiv mit Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme, Gesamtcholesterol, *low density lipoprotein* (LDL)-Cholesterol, Triglyzeriden (TG) und Kreatinin ($p < 0.05$) assoziiert. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine signifikant negative Korrelation von Pref-1 mit BMI sowie dem Inflammationsparameter C reaktivem Protein (CRP) ($p < 0.05$). In multivariaten Regressionsanalysen präsentierte sich Schwangerschaftsalter bei der Blutentnahme als stärkster positiver Prädiktor für Pref-1-Serumkonzentrationen ($p < 0.001$). TG und Kreatinin blieben ebenfalls als unabhängige und positive Prädiktoren für zirkulierendes Pref-1 bestehen ($p < 0.05$). Eine unabhängige und negative Assoziation bestand hingegen zwischen Pref-1 Konzentrationen und BMI sowie CRP ($p < 0.05$).

Weitere Details zu den Daten können der unter 4.1. aufgeführten Publikation entnommen werden.

3.2. Studienpopulation 2: PE

In Studienpopulation 2 wurde zirkulierendes Pref-1 bei Patientinnen mit PE untersucht. Hierfür wurden 51 Frauen mit PE sowie 51 gesunde Alter-gematchte Kontrollschwangerschaften in die Studie eingeschlossen. PE wurde definiert als eine Blutdruckerhöhung >140 mmHg systolisch oder >90 mmHg diastolisch begleitet von Proteinurie bei Frauen, die vor der 20. Schwangerschaftswoche noch normotensiv waren [99]. Patientinnen mit Diabetes mellitus oder vorbestehender Nierenerkrankung wurden von der Studie ausgeschlossen. Bei einem Teil der Studienpopulation (89 Patientinnen, 44 frühere PE-Patientinnen und 45 vorherige Kontrollen) wurden Nüchternblutproben 6 Monate postpartal gewonnen.

In Studienpopulation 2 waren die medianen Pref-1 Serumkonzentrationen in Patientinnen mit PE (0.49 µg/l) signifikant niedriger verglichen zu gesunden Alter-gematchten schwangeren Kontrollen (0.68 µg/l). In den Längsschnittuntersuchungen fiel das zirkulierende Pref-1 von 0.59 µg/l während der Schwangerschaft auf 0.17 µg/l 6 Monate postpartal signifikant ab ($p < 0.001$). Zum Zeitpunkt der Untersuchung nach der Schwangerschaft konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Pref-1 Serumkonzentrationen mehr zwischen ehemaligen PE Patientinnen (0.17 µg/l) und Kontrollen (0.18 µg/l; $p = 0.415$) nachgewiesen werden.

In der univariaten Korrelationsanalyse waren Pref-1-Konzentrationen positiv mit Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme, Schwangerschaftsalter zur Entbindung und Geburtsgewicht des Kindes assoziiert. Es zeigte sich dahingegen eine negative Korrelation von Pref-1 mit BMI, Blutdruck systolisch und diastolisch sowie Leptin. In der multiplen Regressionsanalyse manifestierte sich PE als unabhängiger Prädiktor für zirkulierendes Pref-1 während der Schwangerschaft. Außerdem ergab sich eine unabhängige Assoziation von zirkulierendem Pref-1 mit Leptin sowie dem Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

Weitere Details zu den Daten können der unter 4.2. aufgeführten Publikation entnommen werden.

3.3. Studienpopulation 3: Pref-1 im peripartalen Zeitraum und der humanen Plazenta

In Studienpopulation 3 wurden 40 gesunde schwangere Frauen mit Indikation zur elektiven Sectio rekrutiert. Am Tag der Sectio wurde eine morgendliche Nüchternblutprobe entnommen. Kurz nach dem Eingriff erfolgte das Wiegen der Plazenta und die Gewinnung von Plazentagewebeproben nach standardisiertem Protokoll [100]. Des Weiteren wurde Nabelschnurblut zur Quantifizierung von Pref-1 entnommen. Eine weitere Nüchternblutnientnahme erfolgte innerhalb von 24 h nach der Geburt

In Studienpopulation 3 fielen die mediane maternalen Pref-1-Serumkonzentration signifikant von 0.84 µg/l präpartal auf 0.29 µg/l ($p < 0.001$) postpartal ab. Die immunhistochemischen Experimente zeigten eine signifikante Expression von Pref-1 in humanem Plazentagewebe und hier insbesondere in Synzytiotrophoblasten und Endothelzellen. Die Pref-1-Konzentrationen in der Plazenta betrug 34.2 µg/g Gesamtprotein. Zudem waren die Pref-1-Spiegel in Nabelschnurblutproben mit 35.4 µg/l deutlich und signifikant höher im Vergleich zu Werten im mütterlichen Serum ($p < 0.001$).

Weitere Details zu den Daten können der unter 4.2. aufgeführten Publikation entnommen werden.

4. Publikation

4.1. Serum levels of the adipokine Pref-1 in gestational diabetes mellitus

Titel: Serum levels of the adipokine Pref-1 in gestational diabetes mellitus

Autoren: Wurst U, Ebert T, Kralisch S, Stumvoll M, Fasshauer M.

Einreichung: 12.11.2013

Annahme: 28.10.2014

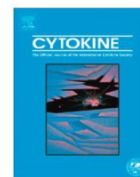
Veröffentlichung: Cytokine

Band 71

Nummer 2

Februar 2015

Seiten 161–164



Serum levels of the adipokine Pref-1 in gestational diabetes mellitus



Ulrike Wurst^{a,b,*}, Thomas Ebert^{a,b,1}, Susan Kralisch^{a,b}, Michael Stumvoll^a, Mathias Fasshauer^{a,b}

^a University of Leipzig, Department of Endocrinology and Nephrology, 04103 Leipzig, Germany

^b Leipzig University Medical Center, IFB AdiposityDiseases, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2013

Received in revised form 11 August 2014

Accepted 28 October 2014

Keywords:

Adipocytes

Gestational diabetes mellitus

Pref-1

Pregnancy

ABSTRACT

Objective: Pref-1 has recently been introduced as a novel insulin resistance-inducing adipokine influencing adipogenesis. The role of circulating Pref-1 in patients with gestational diabetes mellitus (GDM) has not been assessed so far.

Methods: We determined circulating Pref-1 serum levels in 74 patients with GDM, as well as 74 healthy age-, body mass index (BMI)-, and gestational age-matched pregnant controls. Furthermore, Pref-1 was correlated with anthropometric measures, as well as biochemical markers, of glucose homeostasis, lipid metabolism, renal function, and inflammation.

Results: Mean serum Pref-1 levels during pregnancy were not significantly different between patients with GDM (0.40 µg/l) and healthy controls (0.42 µg/l) ($p = 0.655$). Multivariate analysis revealed that gestational age at blood sampling, triglycerides (TG), and creatinine independently and positively predicted Pref-1 levels ($p < 0.05$). Furthermore, Pref-1 levels were independently and negatively associated with BMI and C reactive protein ($p < 0.05$).

Conclusions: Pref-1 is probably not a major contributor to GDM pathophysiology but might directly contribute to TG metabolism, as well as depend on gestational age and renal function.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a metabolic disorder during pregnancy leading to acute and chronic complications in both mother and newborn [1,2]. Based on retrospective and prospective studies, several risk factors for GDM have been demonstrated. Thus, maternal obesity, maternal age, family history of diabetes, different ethnic groups, psychological disorders, e.g. depression, and assisted reproductive technologies increase the probability of a GDM pregnancy [3]. Incidence and prevalence of GDM is rapidly increasing especially in Western countries. The cause of this dramatic rise and the exact pathogenesis of GDM have not been fully understood, so far [3]. However, since the disease shares risk factors with type 2 diabetes mellitus (T2DM), a

relationship between these two disease states is plausible. In the last two decades, dysregulation of various adipocyte-derived factors – so-called adipokines – including adiponectin, leptin, resistin, and adipocyte fatty acid-binding protein has been reported to mediate insulin resistance and proinflammatory effects in both T2DM [4] and GDM [5].

Preadipocyte factor-1 (Pref-1), also known as delta like 1 homologue or fetal antigen-1, has recently been described as a novel adipokine crucially influencing adipogenesis [6], as well as chondrogenic and osteoblast differentiation [7]. Furthermore, Pref-1 has been implicated to directly decrease adipose tissue mass and impair glucose control in vivo [8,9]. Thus, transgenic mice overexpressing Pref-1 in adipose tissue showed a substantial decrease in total fat pad weight and reduced expression of adipokines [8,9]. Furthermore, these animals exhibited decreased insulin sensitivity, impaired glucose tolerance, and hypertriglyceridemia as compared to controls [8,9]. Interestingly, transgenic overexpression of Pref-1 in liver also decreased adipose mass and adipocyte marker expression, suggesting an endocrine mode of action of Pref-1 [8,9]. Since adipose tissue and its secreted adipokines significantly influence glucose homeostasis [10,11], insulin resistance-inducing Pref-1 might contribute to metabolic disease during pregnancy, i.e. GDM. However, to the best of our knowledge,

Abbreviations: BMI, body mass-index; CRP, C reactive protein; FFA, free fatty acids; FI, fasting insulin; GDM, gestational diabetes mellitus; HbA1c, glycosylated hemoglobin A1c; HDL, high density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL, low density lipoprotein; OGTT, oral glucose tolerance test; Pref-1, preadipocyte factor-1; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TG, triglycerides.

* Corresponding author at: Liebigstraße 20, 04103 Leipzig, Germany. Tel.: +49 341 9713318; fax: +49 341 9713389.

E-mail address: ulrike.wurst@medizin.uni-leipzig.de (U. Wurst).

¹ These authors equally contributed to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.015>

1043-4666/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

no study in humans has addressed this issue so far. In the current study, we, therefore, investigated for the first time serum levels of insulin resistance-inducing Pref-1 in 74 women with GDM as compared to 74 healthy, age-, BMI-, and gestational age-matched pregnant controls. Furthermore, we correlated circulating levels of this adipokine with biochemical and clinical markers of obesity, hypertension, renal function, glucose and lipid metabolism, as well as inflammation. We hypothesized that patients with GDM have higher levels of insulin resistance-inducing Pref-1 as compared to healthy pregnant control subjects and that the adipokine is associated with an adverse metabolic profile.

2. Material and methods

2.1. Subjects

For this cross-sectional study, 74 pregnant women with GDM, as well as 74 healthy age-, BMI-, and gestational age-matched pregnant controls, were recruited by the Department of Endocrinology and Nephrology, University of Leipzig. Patients with preexisting diabetes, chronic or generalized inflammation, immunosuppressive treatment, and/or end-stage malignant diseases were excluded. GDM was defined as one or more elevated plasma glucose levels during a 75 g 2 h oral glucose tolerance test (oGTT) according to the criteria of the American Diabetes Association [12]. The following threshold plasma glucose levels were used: fasting ≥ 5.1 mmol/l; 1 h ≥ 10.0 mmol/l; 2 h ≥ 8.5 mmol/l [12]. All participants underwent a thorough clinical examination including anthropometric and laboratory measures. Thus, BMI was determined as weight before gestation divided by squared height. In all patients, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as previously described [13]. The study was approved by the local Ethics Committee and all subjects gave written informed consent before taking part in the study.

2.2. Assays

In all participants, blood samples were taken after an overnight fast and Pref-1 serum concentrations were determined by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The mean sensitivity of the Pref-1 ELISA was 0.012 $\mu\text{g/l}$ (range: 0.005–0.034 $\mu\text{g/l}$). The degree of precision of the ELISA system in terms of intra-assay coefficient of variance was $<4.3\%$ and that of interassay was $<7.1\%$. Spike recovery and linearity were in a range of 91–107% and 97–108%, respectively. Furthermore, the ELISA was specific for human Pref-1 and did not cross-react with a range of recombinant human cytokines including adiponectin, interleukin-6, leptin, monocyte chemoattractant protein-1, resistin, and tumor necrosis factor α . Furthermore, fasting insulin (FI) was determined with a two-site chemiluminescent enzyme immuno-metric assay for the LIAISON automated analyzer (DiaSorin, Saluggia, Italy). Moreover, glycosylated hemoglobin A1c (HbA1c), glucose levels during oGTT, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, TG, free fatty acids (FFA), creatinine, and C reactive protein (CRP) were measured by standard laboratory methods in a certified laboratory.

2.3. Statistical analysis

SPSS software version 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA) was used in all statistical analyses. Differences between anthropometric and biochemical parameters in GDM patients and controls were assessed by non-parametric Mann–Whitney–U-test. Univariate

correlations were performed using non-parametric Spearman's rank correlation method. To adjust the effects of covariates and identify independent relationships, multivariate linear regression analysis was performed. For covariates (e.g. total cholesterol and LDL cholesterol), only the parameter with the strongest association in univariate analysis was included in the multivariate model. Before multivariate correlation analyses were calculated, distribution was tested for normality using Shapiro–Wilk W test and non-normally distributed parameters were logarithmically transformed. A p -value of <0.05 was considered as statistically significant in all analyses.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

Mean \pm SD serum Pref-1 was 0.41 ± 0.23 $\mu\text{g/l}$ in the total sample. Clinical characteristics of the subgroups studied (Controls, GDM) are shown in Table 1. Mean serum Pref-1 levels were not significantly different in pregnancy between patients with GDM (0.40 ± 0.23 $\mu\text{g/l}$) and controls (0.42 ± 0.23 $\mu\text{g/l}$) ($p = 0.655$) (Table 1). Since our cohort was age-, BMI-, and gestational-age matched, no significant differences between these parameters could be shown (Table 1). As expected, parameters of glucose homeostasis (glucose values during oGTT, FI, HOMA-IR) were significantly increased in patients with GDM as compared to control subjects (Table 1). FFA were significantly increased in patients with GDM as compared to controls (Table 1).

3.2. Univariate correlations

When analyzing all subjects, Pref-1 positively correlated with gestational age at blood sampling, total cholesterol, LDL cholesterol, TG, and creatinine ($p < 0.05$) (Table 2). Furthermore, there was a negative association between Pref-1 and BMI, as well as

Table 1

Baseline characteristics of the study population. BMI, body mass index before pregnancy; CRP, C reactive protein; DBP, diastolic blood pressure; FFA, free fatty acids; FI, fasting insulin; HbA1c, glycosylated hemoglobin A1c; HDL, high density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL, low density lipoprotein; Pref-1, preadipocyte factor-1; SBP, systolic blood pressure; TG, triglycerides. Values for median (interquartile range) are shown. p -values as assessed by Mann–Whitney–U-test.

	Controls	GDM	p
n	74	74	
Pref-1 ($\mu\text{g/l}$)	0.35 (0.25)	0.35 (0.21)	0.655
Age (years)	28.9 (4.5)	31.0 (7.5)	0.087
Gestational age at blood sampling (days)	199 (40)	202 (33)	0.568
Gestational age at delivery (days)	275 (15)	273 (14)	0.312
Birth weight (g)	3360 (790)	3400 (805)	0.471
BMI (kg/m^2)	22.4 (6.7)	24.5 (6.6)	0.117
SBP (mm Hg)	125 (17)	120 (20)	0.338
DBP (mm Hg)	75 (13)	73 (15)	0.349
HbA1c (%)	5.3 (0.6)	5.4 (0.6)	0.729
Glucose 0 h (mmol/l)	4.3 (0.5)	4.5 (1.0)	<0.001
Glucose 1 h (mmol/l)	7.5 (1.6)	10.1 (1.7)	<0.001
Glucose 2 h (mmol/l)	6.4 (1.8)	8.7 (2.3)	<0.001
FI (pmol/l)	57.9 (38.3)	70.6 (66.7)	0.003
HOMA-IR	1.56 (0.97)	1.97 (1.90)	<0.001
Cholesterol (mmol/l)	6.31 (1.84)	6.71 (1.74)	0.199
HDL cholesterol (mmol/l)	1.93 (0.51)	1.82 (0.79)	0.419
LDL cholesterol (mmol/l)	3.73 (1.57)	4.05 (1.91)	0.569
TG (mmol/l)	2.07 (1.43)	2.14 (1.31)	0.453
FFA (mmol/l)	0.47 (0.30)	0.55 (0.30)	0.047
Creatinine ($\mu\text{mol/l}$)	49.0 (11.0)	46.0 (11.3)	0.086
CRP (mg/l)	4.20 (4.30)	3.99 (6.09)	0.903

Bold values indicate $p < 0.05$.

Table 2
Univariate correlations with Pref-1 in study population. Abbreviations are indicated in Table 1. *r*- and *p*-values are given.

	<i>r/p</i>
Age (days)	0.053/0.520
Gestational age at blood sampling (days)	0.729/<0.001^a
Gestational age at delivery (days)	0.050/0.135
Birth weight (g)	0.154/0.135
BMI (kg/m ²)	-0.209/0.012^a
SBP (mm Hg)	0.002/0.982
DBP (mm Hg)	0.096/0.260
HbA1c (%)	0.005/0.955
Glucose 0 h (mmol/l)	-0.126/0.126
Glucose 1 h (mmol/l)	-0.030/0.722
Glucose 2 h (mmol/l)	-0.030/0.723
FI (pmol/l)	-0.038/0.650
HOMA-IR	-0.061/0.460
Cholesterol (mmol/l)	0.298/<0.001^a
HDL cholesterol (mmol/l)	-0.096/0.247
LDL cholesterol (mmol/l)	0.274/0.001^a
TG (mmol/l)	0.418/<0.001^a
FFA (mmol/l)	0.096/0.246
Creatinine (μmol/l)	0.270/0.001^a
CRP (mg/l)	-0.290/<0.001^a

Bold values indicate $p < 0.05$.

^a Indicates significant correlation as assessed by Spearman's correlation method.

CRP ($p < 0.05$) (Table 2). In contrast, no significant correlations could be established between serum Pref-1, blood pressure, and markers of glucose homeostasis (Table 2).

3.3. Multivariate regression analysis

To verify independent associations, multiple linear regression analysis was performed. In these analyses, gestational age at blood sampling, TG, and creatinine independently and positively predicted Pref-1 levels ($p < 0.05$) (Table 3). Furthermore, Pref-1 levels remained independently and negatively associated with BMI and CRP ($p < 0.05$) (Table 3).

4. Discussion

In the current study, we show for the first time and in contrast to our initial hypothesis that serum concentrations of the insulin resistance-inducing adipokine Pref-1 are not dysregulated in patients with GDM. Furthermore, the adipokine is not related to markers of impaired glucose control in pregnancy, i.e. glucose levels during oGTT, as well as FI, HOMA-IR, and HbA1c. In contrast to our findings in pregnant subjects, an association between Pref-1 and markers of impaired glucose metabolism has been demonstrated in non-pregnant populations. Here, Kavalkova and

workers demonstrate convincingly that serum Pref-1 concentrations are significantly higher in patients with T2DM as compared to controls [14]. Furthermore, circulating Pref-1 concentrations correlate positively with markers of insulin resistance including FI and HOMA-IR [14]. Similarly, Chacón and co-workers show a positive association between Pref-1 and insulin resistance in a cohort comprising of 127 obese men [15]. Taking these findings into consideration, it is tempting to speculate that Pref-1 might contribute to impaired glucose control in obesity under non-pregnant conditions. However, the adipokine is probably not a major contributor to GDM pathophysiology.

In the current study, TG are independently and positively associated with Pref-1 similar to findings in non-pregnant subjects [15,16]. Here, Chacón and co-workers demonstrate a positive association between Pref-1 and TG in 127 obese men [15]. Furthermore, both parameters are positively correlated in 29 obese subjects in another study [16]. It is interesting to note in this context that hypertriglyceridemia has been reported in a mouse model overexpressing Pref-1 [8]. Taking these findings into consideration, Pref-1 might directly upregulate TG levels under pregnant and non-pregnant conditions.

In our study, Pref-1 is independently and positively associated with gestational age at blood sampling. These data are fully in accordance with two independent reports demonstrating that serum levels [17], as well as placental expression [18] of Pref-1 progressively increase with advancing gestational age.

In our pregnant study population, creatinine is a positive and independent predictor of Pref-1. These data indicate that the adipokine might be eliminated by the kidneys. In accordance with this hypothesis Jensen and co-workers demonstrate that Pref-1 levels are 10 times higher in patients with end-stage renal disease as compared to normal, healthy individuals [19]. Furthermore, using an experimental approach with studies in humans and rats, the authors elegantly and convincingly show that Pref-1 is, in fact, cleared by the kidneys [19]. These and our data suggest that markers of renal function should always be included in studies investigating Pref-1 regulation and physiology. Furthermore, they support previous findings from our group demonstrating that various adipokines are positively and independently related to renal function [20–23].

In the current study, Pref-1 is independently and negatively associated with BMI and CRP in contrast to findings under non-pregnant conditions. Thus, a positive association [15] or no correlation [16] between Pref-1 and BMI has been shown. Furthermore, the adipokine is not associated with CRP in patients undergoing elective hip surgery [19]. The negative association between Pref-1 and CRP seen in our pregnant cohort might even suggest an anti-inflammatory activity in pregnancy. Clearly, more work is needed to better elucidate whether Pref-1 directly interacts with pro- and anti-inflammatory pathways. In addition, the pathophysiological significance of the negative association between Pref-1 and BMI described in our study remains to be determined in future experiments. Furthermore, our results suggest that regulation of Pref-1 in vivo might be different between pregnant and non-pregnant subjects.

There are some limitations of the study that need to be emphasized: First, the study has a cross-sectional design, and, therefore, causality cannot be established. Second, the relatively low HOMA-IR in the GDM group might have prevented detection of significant differences in Pref-1 between GDM and controls. It is important to note in this context that in other large GDM cohorts higher HOMA-IR values were reported as compared to our study population [24–27]. However, ethnic differences were observed between studies [24–27].

Taken together, Pref-1 serum levels are not altered in GDM and are not associated with markers of glucose metabolism in pregnant

Table 3
Multivariate regression analysis between Pref-1 (lg) (dependent variable) and gestational age at blood sampling (lg), BMI (lg), cholesterol, TG (lg), creatinine, as well as CRP (lg). Non-normally distributed variables were logarithmically transformed (lg) prior to testing. Standardized β -coefficients and *p*-values are given. Abbreviations are indicated in Table 1.

Independent variables	β	<i>p</i>
<i>Dependent variable: Pref-1 (lg)</i>		
Gestational age at blood sampling (lg)	0.650	<0.001^a
BMI (lg)	-0.210	<0.001^a
Cholesterol	0.048	0.338
TG (lg)	0.145	0.011^a
Creatinine	0.201	<0.001^a
CRP (lg)	-0.107	0.033^a

Bold values indicate $p < 0.05$.

^a Indicates significant correlation.

subjects. Pref-1 is positively and independently correlated with gestational age, TG, and creatinine in pregnancy. Although probably not a major contributor to GDM pathophysiology, Pref-1 might directly contribute to TG metabolism, as well as depend on gestational age and renal function.

Acknowledgements

This study was supported by grants to M.F. from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB 1052/1, C06), the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001 (IFB AdiposityDiseases, projects K7-3, K7-9, and K7-31), and the Deutsche Hochdruckliga e.V. Furthermore, U.W. and T.E. were supported by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001 (IFB AdiposityDiseases, MDPro1 program/ MetaRot program). Moreover, T.E. was supported by a junior research grant by the Medical Faculty, University of Leipzig and a MSD grant (MSD Stipendium 2013 Diabetologie).

References

- [1] Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1862–8.
- [2] Shah BR, Retnakaran R, Booth GL. Increased risk of cardiovascular disease in young women following gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008;31:1668–9.
- [3] Jovanovic L, Pettitt DJ. Gestational diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286:2516–8.
- [4] Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 2003;46:1594–603.
- [5] Miehle K, Stepan H, Fasshauer M. Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol* 2012;76:2–11.
- [6] Wang Y, Zhao L, Smas C, et al. Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 2010;30:3480–92.
- [7] Wang Y, Sul HS. Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab* 2009;9:287–302.
- [8] Lee K, Villena JA, Moon YS, et al. Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest* 2003;111:453–61.
- [9] Villena JA, Choi CS, Wang Y, et al. Resistance to high-fat diet-induced obesity but exacerbated insulin resistance in mice overexpressing preadipocyte factor-1 (Pref-1) a new model of partial lipodystrophy. *Diabetes* 2008;57:3258–66.
- [10] Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, et al. Tumor necrosis factor- α is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1752–9.
- [11] Xiao JP, Yin YX, Gao YF, et al. The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia. *Cytokine* 2012;60:856–60.
- [12] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012;36:S67–74.
- [13] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- [14] Kavalkova P, Touskova V, Roubicek T, et al. Serum preadipocyte factor-1 concentrations in females with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of very low calorie diet, acute hyperinsulinemia, and fenofibrate treatment. *Horm Metab Res* 2013;45:820–6.
- [15] Chacón MR, Miranda M, Jensen CH, et al. Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *Int J Obes* 2008;32:1122–9.
- [16] O'Connell J, Lynch L, Hogan A, et al. Preadipocyte factor-1 is associated with metabolic profile in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E680–4.
- [17] Floridon C, Jensen CH, Thorsen P, et al. Does Fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation* 2000;66:49–59.
- [18] Butterwith SC, Peddie D, Belloir B, et al. Preadipocyte factor-1 expression in the mouse embryo and placenta. *Biochem Soc Trans* 1996;24:164S.
- [19] Jensen CH, Krogh TN, Støving RK, et al. Fetal antigen 1 (FA1), a circulating member of the epidermal growth factor (EGF) superfamily: ELISA development, physiology and metabolism in relation to renal function. *Clin Chim Acta* 1997;268:1–20.
- [20] Pfau D, Bachmann A, Lössner U, et al. Serum levels of the adipokine chemerin in relation to renal function. *Diabetes Care* 2010;33:171–3.
- [21] Stein S, Bachmann A, Lössner U, et al. Serum levels of the adipokine fgf21 depend on renal function. *Diabetes Care* 2009;32:126–8.
- [22] Richter J, Focke D, Ebert T, et al. Serum levels of the adipokine progranulin depend on renal function. *Diabetes Care* 2013;36:410–4.
- [23] Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, et al. Serum levels of adipokine retinol-binding protein-4 in relation to renal function. *Diabetes Care* 2007;30:2588–92.
- [24] Endo S, Maeda K, Suto M, et al. Differences in insulin sensitivity in pregnant women with overweight and gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:343–9.
- [25] Ismail NAM, Kasim MM, Noor Aizuddin A, et al. Homeostatic indices of insulin resistance among gestational diabetics in anticipating pregnancy complications. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 2013;29:691–4.
- [26] Yilmaz O, Kucuk M, Ilgin A, et al. Assessment of insulin sensitivity/resistance and their relations with leptin concentrations and anthropometric measures in a pregnant population with and without gestational diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat* 2010;24:109–14.
- [27] Shaat N, Ekelund M, Lernmark Å, et al. Genotypic and phenotypic differences between Arabian and Scandinavian women with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2004;47:878–84.

4.2. The adipokine preadipocyte factor-1 is downregulated in preeclampsia and expressed in placenta

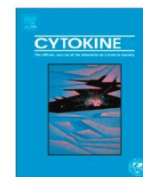
Titel: The adipokine preadipocyte factor-1 is downregulated in preeclampsia and expressed in placenta

Autoren: Schrey S, Wurst U (equally contributing), Ebert T, Kralisch S, Drewlo S, Stepan H, Lössner U, Platz M, Kratzsch J, Stumvoll M, Fasshauer M.

Einreichung: 16.01.2015

Annahme: 22.07.2015

Veröffentlichung: Cytokine
Nummer 75
Band 2
Oktober 2015
Seiten 338–343



The adipokine preadipocyte factor-1 is downregulated in preeclampsia and expressed in placenta



Susanne Schrey^a, Ulrike Wurst^{b,c,*}, Thomas Ebert^{b,c}, Susan Kralisch^{b,c}, Sascha Drewlo^d, Holger Stepan^{a,1}, Ulrike Lössner^{b,c}, Martin Platz^{b,c}, Jürgen Kratzsch^e, Michael Stummvoll^b, Mathias Fasshauer^{b,c}

^a University of Leipzig, Department of Obstetrics, 04103 Leipzig, Germany

^b University of Leipzig, Department of Endocrinology and Nephrology, 04103 Leipzig, Germany

^c Leipzig University Medical Center, IFB AdiposityDiseases, 04103 Leipzig, Germany

^d Centre for Trophoblast Research, Medical School, Wayne State University, Detroit, MI, USA

^e University of Leipzig, Institute of Laboratory Medicine, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 January 2015

Received in revised form 10 July 2015

Accepted 22 July 2015

Available online 1 August 2015

Keywords:

Preeclampsia

Pref-1

Adipogenesis

Placenta

Cesarean section

ABSTRACT

Background: Adipokines contribute to the development of preeclampsia (PE), a severe pregnancy complication which increases the future risk for cardiovascular and metabolic disease in both mother and newborn. Pre-adipocyte factor-1 (Pref-1) was recently introduced as a novel antiangiogenic and antiadipogenic adipokine.

Material and methods: Pref-1 was quantified in patients with PE ($n = 51$) and healthy pregnant controls ($n = 51$) during pregnancy, as well as 6 months after delivery (study population 1). Furthermore, Pref-1 was investigated in the immediate periparturient period and the placenta in 40 healthy pregnant women undergoing elective cesarean section (study population 2).

Results: In study population 1, median Pref-1 serum concentrations during pregnancy were significantly lower in women with PE ($0.5 \mu\text{g/l}$) as compared to healthy pregnant controls ($0.7 \mu\text{g/l}$) ($p < 0.001$). Furthermore, Pref-1 serum concentrations were independently predicted by PE, leptin levels, and gestational age in this population. In both study populations, Pref-1 serum levels significantly decreased after delivery as compared to prepregnancy levels. Moreover, significant expression of Pref-1 was detected in placental tissue.

Conclusion: Maternal Pref-1 serum concentrations are significantly decreased in PE. The pathophysiological significance of this regulation needs to be studied in more detail in future experiments.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Preeclampsia (PE) is a severe disorder during pregnancy affecting several organ systems. PE is characterized by new-onset hypertension and proteinuria during the second half of gestation and represents a leading cause of maternal and fetal morbidity and mortality [1]. Both mother and newborn share an increased future risk for cardiovascular and metabolic disease after a PE pregnancy [1,2]. The pathogenesis of PE has not been fully understood, so far. However, recent studies suggest that a dysbalance of angiogenic and antiangiogenic factors including soluble fms-like tyrosine kinase 1 and endoglin might contribute to PE development

[3–6]. In addition, adipocyte-secreted proteins – so-called adipokines – have been implicated in the pathogenesis of the disease [7]. Thus, the appetite-suppressive adipokine leptin is increased in PE and precedes the clinical onset of the disease [8].

Preadipocyte factor-1 (Pref-1), also known as delta like 1 homologue or fetal antigen-1, has recently been described as a novel adipokine crucially influencing adipogenesis. Thus, Pref-1 inhibits adipocyte differentiation via an extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway [9]. Pref-1 inhibits not only adipose tissue but also chondrogenic, as well as osteoblast differentiation via induction of Sox9 [10]. Interestingly, a recent study by Chacón and co-workers showed upregulation of circulating Pref-1 concentrations with increasing body weight in 127 men [11]. Moreover, Pref-1 levels decreased 6 months after bariatric surgery [11]. Most interestingly, Pref-1 stimulated expression of proinflammatory cytokines including

* Corresponding author at: Liebigstraße 20, 04103 Leipzig, Germany.

E-mail address: Ulrike.Wurst@medizin.uni-leipzig.de (U. Wurst).

¹ These authors equally contributed to this work.

tumor necrosis factor α , monocyte chemoattractant protein-1, and interleukin-6 in human monocytes and mature adipocyte cell lines *in vitro* [11]. In addition, it has recently been demonstrated convincingly by Rodríguez and co-workers that Pref-1 has potent antiangiogenic properties besides its antiadipogenic effects [12].

In contrast to other proteins influencing angiogenesis [3–6] and other adipokines [13–19], regulation of antiangiogenic and antiadipogenic Pref-1 has not been elucidated in PE. Moreover, the contribution of the placenta to circulating Pref-1 has not been assessed. In the current study, we, therefore, investigated (1) Pref-1 in 51 women with PE as compared to 51 normotensive, healthy controls during and after pregnancy (study population 1); and (2) placental Pref-1 expression and regulation during the immediate perinatal period in 40 healthy women undergoing elective Cesarean section (study population 2). We hypothesized that serum levels of antiangiogenic and antiadipogenic Pref-1 are increased in PE and that the placenta significantly contributes to circulating Pref-1.

2. Material and methods

2.1. Study population 1 – Pref-1 in PE

For the first study, 102 women with PE ($n = 51$) and healthy pregnant controls ($n = 51$) were recruited from the Department of Obstetrics, University of Leipzig. PE was defined as gestational blood pressure elevation >140 mmHg systolic or >90 mmHg diastolic accompanied by proteinuria in women who were normotensive before 20 weeks of gestation as described in more detail in Ref. [20]. Patients with diabetes mellitus or pre-existing kidney disease were excluded from the study. In a subset of the initial study population, fasting blood samples from 89 (44 former patients with PE; 45 former controls) out of 102 women were collected six months after delivery. These women underwent the same clinical examination as during pregnancy.

2.2. Study population 2 – Pref-1 in the peripartal period and expression in the placenta

For the second study, 40 healthy women with singleton pregnancies were consecutively recruited from the Department of Obstetrics, University of Leipzig. Patients with generalized or other chronic inflammation, liver disease, and diabetes mellitus were excluded. In all patients, elective Cesarean section was performed for indications including breech presentation, previous Cesarean section, or prior surgery of the uterus. On the day of delivery, a fasting blood specimen was taken in the morning. Soon after delivery, placenta was weighed and placental biopsies were obtained similar to Ref. [21] and cord blood samples were collected. Moreover, fasting blood samples were again taken within 24 h after delivery.

2.3. Clinical assessment

All participants of both studies underwent a thorough clinical examination at both time points. Body mass index (BMI) was determined as weight before gestation divided by squared height. At the follow-up examination of study population 1, BMI was assessed as weight divided by squared height. In all patients, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as previously described [22]. Both studies were approved by the local Ethics Committee and all subjects gave written informed consent before taking part in the study.

2.4. Assays

All blood samples were obtained after an overnight fast and none of the women was in labour at the time of blood sampling. Serum was immediately separated by centrifugation at 4000 g for 10 min and frozen at -80 °C. Circulating Pref-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN and Raybiotech, Norcross, GA), leptin (Mediagnost, Reutlingen, Germany), adiponectin (Mediagnost, Reutlingen, Germany), and high sensitive interleukin-6 (hsIL-6; R&D Systems, Minneapolis, MN,) were determined with commercial ELISAs according to the manufacturers' instructions. PE patients and controls were present in equal parts on each ELISA plate during Pref-1 measurement to minimize interassay and batch effects. Serum creatinine, fasting glucose (FG), fasting insulin (FI), free fatty acids (FFA), total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides (TG), and C-reactive protein (CRP) were determined by standard laboratory methods in a certified laboratory.

2.5. Immunohistochemistry of placental biopsies

For immunohistochemistry (IHC) of placental biopsies, paraffin-embedded tissue sections were processed as described [23]. Slides were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: Pref-1 (ab110636; dilution 1:200; Abcam, Cambridge, UK), CD31 (M0823; dilution 1:100; Dako, Hamburg, Germany), CD68 (M0718; dilution 1:100; Dako, Hamburg, Germany), and Cyk7 (M7018; dilution 1:100; Dako, Hamburg, Germany). For negative control experiments, the primary antibody against Pref-1 was incubated with recombinant Pref-1 protein (ab132238; dilution 1:10; Abcam, Cambridge, UK) for 2 h prior to staining. After incubation with biotinylated secondary antibody (Dako, Hamburg, Germany) for 30 min, specific staining was detected by a labelled streptavidin biotin kit (K0679; Dako, Hamburg, Germany). After counterstaining with Hemalaun and dehydration in ethanol, slides were covered with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

2.6. Statistical analysis

All data were analyzed with SPSS software version 20.0 (IBM, Armonk, NY). In study population 1, differences in circulating Pref-1 levels between control and PE patients during pregnancy or after pregnancy were assessed by Mann–Whitney–U test. In both study populations, longitudinal changes (antepartum vs. postpartum) in Pref-1 serum concentrations within the same individuals were analyzed using Wilcoxon signed-rank test for related samples. All univariate correlation analyses were performed using Spearman's rank correlation method. Afterward, multivariate linear regression analyses were performed to adjust the effects of covariates and identify independent relationships. Before multivariate correlation analyses were calculated, distribution was tested for normality using Shapiro–Wilk W test and non-normally distributed parameters were logarithmically transformed. A p -value of <0.05 was considered as statistically significant in all analyses.

3. Results

3.1. Study population 1 – Pref-1 in PE

3.1.1. Baseline characteristics

Table 1 summarizes the clinical characteristics of the two subgroups (Control, PE). Median [interquartile range] serum Pref-1 levels were significantly lower in patients with PE (0.5 [0.2] $\mu\text{g/l}$)

Table 1

Baseline characteristics of study population 1. BMI, Body mass index; CRP, C-reactive protein; DBP, Diastolic blood pressure; FFA, Free fatty acids; FG, Fasting glucose; FI, Fasting insulin; HDL, High density lipoprotein; HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance; hsIL-6, high sensitive interleukin-6; LDL, Low density lipoprotein; PE, Preeclampsia; Pref-1, Preadipocyte factor-1; SBP, Systolic blood pressure; TG, Triglycerides. Values for median (interquartile range) are shown.

	Control	PE	p
N	51	51	
Pref-1 (µg/l)	0.7 (0.4)	0.5 (0.2)	<0.001*
Age (years)	30 (7)	30 (11)	0.480
Gestational age at blood sampling (days)	197 (26)	208 (37)	0.018*
Gestational age at delivery (days)	274 (31)	216 (37)	<0.001*
Birth weight (g)	3115 (1216)	1215 (904)	<0.001*
BMI (kg/m ²)	22.0 (4.3)	22.7 (5.9)	0.060
SBP (mmHg)	115 (19)	159 (28)	<0.001*
DBP (mmHg)	70 (15)	100 (18)	<0.001*
Creatinine (µmol/l)	54 (10)	66 (16)	<0.001*
FG (mmol/l)	3.6 (0.9)	3.8 (1.4)	0.049*
FI (pmol/l)	58.9 (38.3)	73.9 (64.4)	0.064
HOMA-IR	1.3 (1.0)	1.7 (2.1)	0.012*
FFA (mmol/l)	0.4 (0.3)	0.8 (0.5)	<0.001*
Cholesterol (mmol/l)	6.5 (1.7)	6.7 (1.8)	0.500
HDL cholesterol (mmol/l)	1.8 (0.7)	1.8 (0.6)	0.924
LDL cholesterol (mmol/l)	3.9 (1.3)	3.4 (1.3)	0.028*
TG (mmol/l)	2.2 (1.1)	3.4 (1.2)	<0.001*
CRP (mg/l)	2.5 (3.8)	8.2 (14.8)	<0.001*
hsIL-6 (ng/l)	0.9 (0.8)	2.2 (2.1)	<0.001*
Leptin (µg/l)	20.4 (11.8)	41.0 (36.9)	<0.001*
Adiponectin (mg/l)	7.4 (4.0)	11.7 (10.0)	<0.001*

Values in bold imply statistical significance ($p < 0.05$).

* Indicates $p < 0.05$ as compared to control as assessed by Mann–Whitney–U test.

as compared to healthy pregnant controls (0.7 [0.4] µg/l) ($p < 0.001$) (Table 1). This difference remained statistically significant when Pref-1 concentrations were adjusted for gestational age at blood sampling, age, and BMI ($p < 0.001$) (data not shown). Maternal age and BMI were not significantly different in the two groups (Table 1). Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure, gestational age at blood sampling, serum creatinine, FG, HOMA-IR, FFA, TG, CRP, hsIL-6, leptin, and adiponectin were significantly higher in patients with PE as compared to controls (Table 1). In contrast, gestational age at delivery, birth weight, and LDL cholesterol were significantly lower in PE as compared to control patients. In longitudinal analysis, maternal Pref-1 levels were significantly lower in patients 6 months after delivery (0.2 [0.1] µg/l) as compared to pregnant women (0.6 [0.3] µg/l) in the total sample ($p < 0.001$) (Fig. 1A). Six months after delivery, no differences in Pref-1 serum levels between the 2 groups could be demonstrated (former PE: 0.2 [0.1] µg/l; former control patients: 0.2 [0.1] µg/l; $p = 0.415$).

3.1.2. Univariate correlations

In study population 1, Pref-1 serum levels during pregnancy were positively correlated with gestational age at blood sampling, gestational age at delivery, and birth weight (Table 2). In contrast, antepartum circulating Pref-1 was negatively associated with BMI, SBP, and DBP, as well as leptin (Table 2).

3.1.3. Multivariate regression analysis

Multiple regression analysis revealed that PE independently predicted circulating Pref-1 during pregnancy even after adjustment for gestational age at blood sampling, birth weight, and leptin (Table 2). Furthermore, antepartum Pref-1 serum concentrations remained independently associated with leptin and gestational age at blood sampling (Table 2).

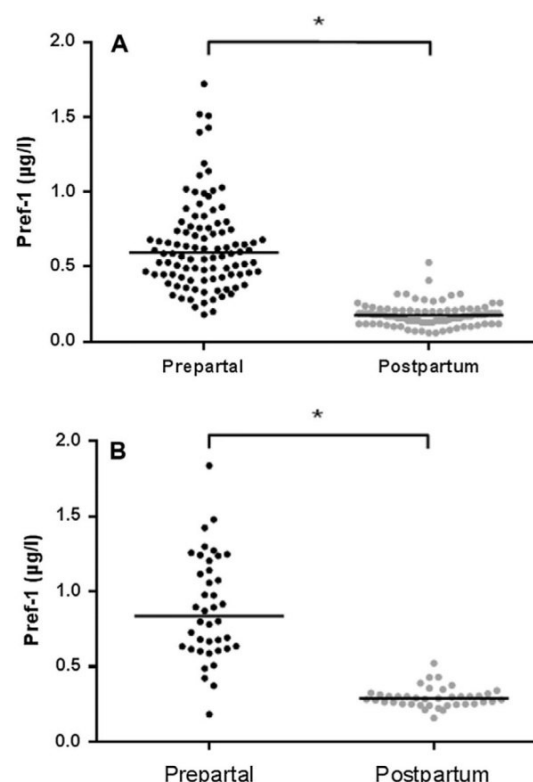


Fig. 1. Circulating Pref-1 serum concentrations during and after pregnancy in (A) study population 1 (median postpartum time point: 6 months after delivery) and (B) study population 2 (median postpartum time point: 21.5 h after delivery). * indicates $p < 0.05$ as assessed by Wilcoxon signed-rank test.

3.2. Study population 2 – Pref-1 in the peripartum period and expression in the placenta

3.2.1. Pref-1 serum levels in the peripartum period

Clinical characteristics of study population 2 are shown in Table 3. Median serum Pref-1 was 0.8 [0.6] µg/l in the total sample before elective Cesarean section and 0.3 [0.1] µg/l on the first postpartum morning after delivery ($p < 0.001$) (Fig. 1B). Cord blood Pref-1 serum concentrations (35.4 [10.9] µg/l) were significantly higher as compared to prepartal maternal levels ($p < 0.001$) (Table 3).

3.2.2. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry revealed that Pref-1 is significantly expressed in the human placenta (Fig. 2A and B). Specific staining with antibodies against endothelium (anti-CD31, Fig. 2C), macrophages (anti-CD68, Fig. 2D), and trophoblasts (anti-Cy7, Fig. 2E) suggests that Pref-1 is predominantly expressed in the syncytiotrophoblasts and in the endothelium, as well as to a lesser extent in macrophages (Fig. 2). Median Pref-1 concentration in placental tissue was 34.2 [12.2] µg/g total protein (Table 3).

4. Discussion

In the current study, we demonstrate in contrast to our initial hypothesis that maternal serum concentrations of Pref-1 are significantly lower in patients with PE as compared to healthy pregnant controls. PE remains an independent negative predictor of Pref-1 levels during pregnancy. In contrast, recent work from our group

Table 2

Univariate correlations with Pref-1 in study population 1 and multivariate regression analysis between Pref-1 (lg) (dependent variable) and group, gestational age at blood sampling (lg), as well as birth weight (lg) and leptin (lg). Non-normally distributed variables were logarithmically transformed (lg) prior to multivariate testing. *r*- and *p*-values, as well as standardized β -coefficients and *p*-values, are given. Abbreviations are indicated in Table 1.

	Univariate correlations	Multivariate regression analysis	
	<i>r/p</i>	β	<i>p</i>
Group (PE/control)	–	–0.304	0.037^b
Age (years)	–0.002/0.985	–	–
Gestational age at blood sampling (days)	0.388/<0.001^a	0.540	<0.001^b
Gestational age at delivery (days)	0.284/0.005^a	–	–
Birth weight (g)	0.292/0.004^a	–0.046	0.718
BMI (kg/m ²)	–0.298/0.002^a	–	–
SBP (mmHg)	–0.357/<0.001^a	–	–
DBP (mmHg)	–0.374/<0.001^a	–	–
Creatinine (μ mol/l)	–0.137/0.169	–	–
FG (mmol/l)	–0.121/0.225	–	–
FI (pmol/l)	–0.170/0.087	–	–
HOMA-IR	–0.180/0.070	–	–
FFA (mmol/l)	–0.098/0.327	–	–
Cholesterol (mmol/l)	0.104/0.297	–	–
HDL cholesterol (mmol/l)	–0.123/0.219	–	–
LDL cholesterol (mmol/l)	0.151/0.129	–	–
TG (mmol/l)	0.036/0.722	–	–
CRP (mg/l)	–0.137/0.170	–	–
hsIL-6 (ng/l)	0.093/0.357	–	–
Leptin (μ g/l)	–0.385/<0.001^a	–0.230	0.025^b
Adiponectin (mg/l)	–0.166/0.095	–	–

Values in bold imply statistical significance (*p* < 0.05).

^a Indicates significant correlation as assessed by Spearman's correlation method.

^b Indicates significant correlation in multivariate analysis.

indicates that serum Pref-1 concentrations are not significantly altered in another pregnancy complication, i.e. gestational diabetes mellitus [24].

To the best of our knowledge, Pref-1 has not been measured in PE in the maternal circulation. However, Zhou and co-workers have quantified Pref-1 in cord blood samples [25]. The authors demonstrate convincingly that fetal Pref-1 is increased in severe PE as compared to mild PE, gestational hypertension, and normal pregnancy [25]. These results are in contrast to our findings in maternal serum and suggest that circulating maternal and fetal Pref-1 levels are regulated by different mechanisms in PE. Moreover, Díaz and co-workers show convincing evidence that placental Pref-1 expression is decreased in small-for-gestational-age (SGA) fetuses and associated with postnatal weight gain [26]. The placenta plays a significant role in the development of PE with an aberrant invasion of cytotrophoblasts and their failure to adopt an endothelial phenotype seen in the disease [27].

Table 3

Baseline characteristics of study population 2. Abbreviations are indicated in Table 1. Values for median (interquartile range) or absolute numbers (N) are shown.

	Baseline characteristics
N	40
Gestational age at blood sampling (days)	271 (7)
Gestational age at delivery (days)	271 (7)
Time between blood sampling (h)	21.5 (1.75)
Birth weight (g)	3125 (773)
Placental weight (g)	598 (200)
Age (years)	31 (6)
BMI (kg/m ²)	22.9 (5.1)
SBP (mmHg)	113 (18)
DBP (mmHg)	78 (11)
Placental Pref-1 (μ g/g total protein)	34.2 (12.2)
Pref-1 cord blood serum (μ g/l)	35.4 (10.9)

Immunohistochemistry of placental tissue in our study population 2 reveals placental expression of Pref-1 mainly by endothelium and cytotrophoblasts. Therefore, it is tempting to speculate, that aberrant cytotrophoblast development and endothelial dysfunction in PE might contribute to reduced placental expression of Pref-1 in SGA fetuses. Unfortunately, cord blood samples and placental biopsies are not available in study population 1. Therefore, the influence of PE on fetal and placental Pref-1 cannot be assessed in our PE cohort. Moreover, circadian effects on maternal circulating Pref-1 might occur. However, it needs to be emphasized that all blood samples in our study were obtained in the morning after an overnight fast.

The physiological significance of paradoxically decreased Pref-1 in PE remains to be established. It is interesting to note in this context, that Rodríguez and co-workers demonstrate convincingly that Pref-1 is a strong inhibitor of angiogenesis [12]. Taking these results into consideration, it is tempting to speculate that downregulation of Pref-1 in PE is a compensatory mechanism to diminish the adverse vascular effects of the disease. Clearly, more work is needed to better elucidate the pathophysiological significance of Pref-1 downregulation in pregnancies complicated by PE.

In the current study, we show that circulating Pref-1 concentrations decrease after delivery as compared to levels observed during pregnancy in both study populations. These results indicate that the placenta might contribute to circulating Pref-1. In accordance with this hypothesis, Pref-1 is significantly expressed in the placenta in immunohistochemical analyses in our study. More specifically, synthesis of the adipokine is found in syncytiotrophoblasts, endothelial cells, and to a lesser extent in macrophages. Furthermore, median Pref-1 concentration in placental tissue is >30 μ g/g total protein. In agreement with our findings, expression of Pref-1 in the placenta has also been shown by independent groups [28,29]. Based on these data, it is tempting to speculate that decreased placental expression of Pref-1 in PE contributes to reduced serum levels found in the disease during pregnancy. It is interesting to note in this context that differences in Pref-1 in PE do not persist postpartum in study population 1.

In multivariate analysis, Pref-1 is independently and positively associated with gestational age in study population 1. These findings are in accordance with the hypothesis that Pref-1 synthesis increases during gestation in parallel with placenta growth. In agreement with our data, Floridon and co-workers demonstrate convincingly that Pref-1 serum levels increase from 17 weeks of gestation onwards [29]. Furthermore, placental expression of Pref-1 also increases with gestational age in mice [30].

Interestingly, Pref-1 serum levels are more than 40-fold higher in cord blood as compared to prepregnant maternal concentrations in study population 2. These results are well in accordance with findings by de Zegher and co-workers who demonstrate convincingly that circulating Pref-1 is more than 25-fold higher in cord blood as compared to the maternal circulation [31]. It remains to be determined whether transposition of Pref-1 between fetal and maternal circulation occurs.

In our current study, leptin independently and negatively predicts circulating Pref-1 in study population 1. Since Pref-1 is an adipokine with antiadipogenic properties, it is tempting to speculate that high circulating levels might directly decrease fat mass, thereby, also diminishing circulating leptin. It is interesting to note in this context that mice overexpressing Pref-1 develop partial lipodystrophy which is accompanied by decreased leptin levels [32]. Furthermore, a negative association between Pref-1 and leptin has also been shown in other non-pregnant populations [33]. Pref-1 is not significantly associated with markers of inflammation including CRP and hsIL-6 in univariate analysis. These results argue against an important role of inflammation in Pref-1 concentration variation in our cohort.

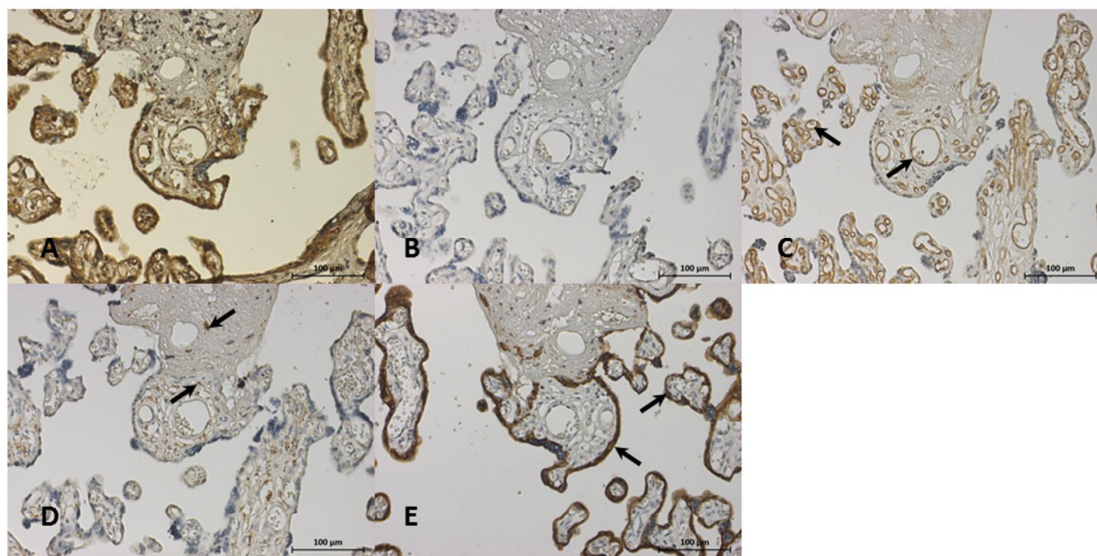


Fig. 2. Immunohistochemical analysis of Pref-1 protein synthesis in placental tissue. Specific staining with antibodies against (A) Pref-1, (B) Pref-1 after 2 h preincubation with recombinant Pref-1 protein (negative control), (C) CD31, (D) CD68, and (E) Cyk7, was performed as described in Materials and Methods. Representative samples from four independent experiments are shown. Black arrows indicate representative staining for (C) endothelium, (D) macrophages, and (E) cytotrophoblasts.

Taken together, we show that maternal Pref-1 serum concentrations are significantly decreased in PE. The pathophysiological significance of this regulation needs to be studied in more detail in future experiments.

Disclosure

No conflict of interest is declared.

Acknowledgements

This study was supported by grants to M.F. from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB 1052/1, C06), the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001 (IFB AdiposityDiseases, projects K7-58), and the Deutsche Hochdruckliga e.V. U.W. was supported by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001 (IFB AdiposityDiseases, MD Pro1 and MD Pro2 programs). Furthermore, T.E. was supported by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001 (IFB AdiposityDiseases, MetaRot program), as well as by a MSD grant (MSD Stipendium 2013 Diabetologie).

References

- [1] B. Sibai, G. Dekker, M. Kupferminc, Pre-eclampsia, *Lancet* 365 (9461) (2005) 785–799.
- [2] D.S. Feig, B.R. Shah, L.L. Lipscombe, C.F. Wu, J.G. Ray, J. Lowe, et al., Preeclampsia as a risk factor for diabetes: a population-based cohort study, *PLoS Med.* 10 (4) (2013) e1001425.
- [3] H. Stepan, A. Geide, R. Faber, Soluble fms-like Tyrosine Kinase 1, *N Engl. J. Med.* 351 (21) (2004) 2241–2242.
- [4] H. Stepan, R. Faber, Elevated sFlt1 level and preeclampsia with parvovirus-induced hydrops, *N Engl. J. Med.* 354 (17) (2006) 1857–1858.
- [5] H. Stepan, T. Walther, Questionable role of the angiotensin II receptor subtype 1 autoantibody in the pathogenesis of preeclampsia, *Hypertension* 50 (1) (2007) e3.
- [6] H. Stepan, A. Unversucht, N. Wessel, R. Faber, Predictive value of maternal angiogenic factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion, *Hypertension* 49 (4) (2007) 818–824.
- [7] K. Miehle, H. Stepan, M. Fasshauer, Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia, *Clin. Endocrinol.* 76 (1) (2012) 2–11.
- [8] L. Poston, Leptin and preeclampsia, *Semin. Reprod. Med.* 20 (2) (2002) 131–138.
- [9] Y. Wang, L. Zhao, C. Smas, H.S. Sul, Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation, *Mol. Cell. Biol.* 30 (14) (2010) 3480–3492.
- [10] Y. Wang, H.S. Sul, Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9, *Cell Metab.* 9 (3) (2009) 287–302.
- [11] M.R. Chacón, M. Miranda, C.H. Jensen, J.M. Fernández-Real, N. Vilarrasa, C. Gutiérrez, et al., Human serum levels of fetal antigen 1 (FAI/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro, *Int. J. Obes.* 32 (7) (2008) 1122–1129.
- [12] P. Rodríguez, M.A. Higuera, A. González-Rajal, A. Alfranca, M. Fierro-Fernández, R.A. García-Fernández, et al., The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis, *Cardiovasc. Res.* 93 (2) (2012) 232–241.
- [13] M. Fasshauer, J. Seeger, T. Waldeyer, S. Schrey, T. Ebert, J. Kratzsch, et al., Serum levels of the adipokine adipocyte fatty acid-binding protein are increased in preeclampsia, *Am. J. Hypertens.* 21 (5) (2008) 582–586.
- [14] H. Stepan, A. Philipp, I. Roth, S. Kralisch, A. Jank, W. Schaarschmidt, et al., Serum levels of the adipokine chemerin are increased in preeclampsia during and 6 months after pregnancy, *Regul. Pept.* 168 (1–3) (2011) 69–72.
- [15] H. Stepan, K. Kley, J. Hindricks, S. Kralisch, A. Jank, W. Schaarschmidt, et al., Serum levels of the adipokine fibroblast growth factor-21 are increased in preeclampsia, *Cytokine* 62 (2) (2013) 322–326.
- [16] H. Stepan, A. Philipp, I. Roth, S. Kralisch, A. Jank, W. Schaarschmidt, et al., Serum levels of the adipokine zinc- α -glycoprotein are increased in preeclampsia, *J. Endocrinol. Invest.* 35 (6) (2012) 562–565.
- [17] H. Stepan, A. Philipp, M. Reiche, K. Klostermann, S. Schrey, C. Reisenbuchler, et al., Serum levels of the adipokine lipocalin-2 are increased in preeclampsia, *J. Endocrinol. Invest.* 33 (9) (2010) 629–632.
- [18] H. Stepan, J. Richter, K. Kley, S. Kralisch, A. Jank, W. Schaarschmidt, et al., Serum levels of growth arrest specific protein 6 are increased in preeclampsia, *Regul. Pept.* 182 (2013) 7–11.
- [19] M. Fasshauer, T. Waldeyer, J. Seeger, S. Schrey, T. Ebert, J. Kratzsch, et al., Serum levels of the adipokine visfatin are increased in pre-eclampsia, *Clin. Endocrinol.* 69 (1) (2008) 69–73.
- [20] National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183(1) (2000) S1–S22.
- [21] S. Drevwlo, M. Czikk, D. Baczyk, S. Lye, J. Kingdom, Glial cell missing-1 mediates over-expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in severe pre-eclamptic placental villi, *Hum. Reprod.* 26 (5) (2011) 1025–1034.
- [22] D.R. Matthews, J.P. Hosker, A.S. Rudenski, B.A. Naylor, D.F. Treacher, R.C. Turner, Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man, *Diabetologia* 28 (7) (1985) 412–419.

- [23] S. Schrey, J. Kingdom, D. Baczyk, B. Fitzgerald, S. Keating, G. Ryan, et al., Leptin is differentially expressed and epigenetically regulated across monozygotic twin placenta with discordant fetal growth, *Mol. Hum. Reprod.* 19 (11) (2013) 764–772.
- [24] U. Wurst, T. Ebert, S. Kralisch, M. Stumvoll, M. Fasshauer, Serum levels of the adipokine Pref-1 in gestational diabetes mellitus, *Cytokine* 71 (2) (2015) 161–164.
- [25] Q. Zhou, J. Li, H. Wang, C. Han, T. Tian, Q. Zhu, et al., Serum preadipocyte factor-1 is increased in fetuses of pregnancy complicated with severe preeclampsia, *Clin. Chim. Acta* 23 (424) (2013) 212–215.
- [26] M. Díaz, J. Bassols, G. Aragonés, E. Mazarico, A. López-Bermejo, L. Ibáñez, Decreased placental expression of pre-adipocyte factor-1 in children born small-for-gestational-age: association to early postnatal weight gain, *Placenta* 34 (4) (2013) 331–334.
- [27] C.E. Powe, R.J. Levine, S.A. Karumanchi, Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease, *Circulation* [Internet] 123 (24) (2011). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3148781/> (cited 2015 July 7).
- [28] A. Yevtdiyenko, J.V. Schmidt, Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta, *Dev. Dyn.* 235 (4) (2006) 1115–1123.
- [29] C. Floridon, C.H. Jensen, P. Thorsen, O. Nielsen, L. Sunde, J.G. Westergaard, et al., Does Fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation, *Differentiation* 66 (1) (2000) 49–59.
- [30] S.C. Butterwith, D. Peddie, B. Belloir, M. Clinton, Preadipocyte factor-1 expression in the mouse embryo and placenta, *Biochem. Soc. Trans.* 24 (2) (1996) 164S.
- [31] F. de Zegher, M. Díaz, G. Sebastiani, A. Martín-Ancel, D. Sánchez-Infantes, A. López-Bermejo, et al., Abundance of circulating preadipocyte factor 1 in early life, *Diabetes Care* 35 (4) (2012) 848–849.
- [32] J.A. Villena, C.S. Choi, Y. Wang, S. Kim, Y.-J. Hwang, Y.-B. Kim, et al., Resistance to high-fat diet-induced obesity but exacerbated insulin resistance in mice overexpressing preadipocyte factor-1 (Pref-1) a new model of partial lipodystrophy, *Diabetes* 57 (12) (2008) 3258–3266.
- [33] P.K. Fazeli, M.A. Bredella, M. Misra, E. Meenaghan, C.J. Rosen, D.R. Clemmons, et al., Preadipocyte factor-1 is associated with marrow adiposity and bone mineral density in women with anorexia nervosa, *JCEM* 95 (1) (2010) 407–413.

4.3. Nachweis über die Anteile der Co-Autoren

Titel: Serum levels of the adipokine Pref-1 in gestational diabetes mellitus

Journal: Cytokine 71 (2015); 161–164

Autoren: Wurst U, Ebert T, Kralisch S, Stumvoll M, Fasshauer M.

Anteil Ulrike Wurst:

- Projektidee
- Konzeption
- Patientenrekrutierung
- Statistische Erfassung
- Medizinische Dokumentation
- Analyse und Verarbeitung der Daten
- Schreiben und Endkorrektur der Publikation

Anteil Thomas Ebert (Autor 2):

- Patientenrekrutierung
- Analyse und Verarbeitung der Daten
- Schreiben und Korrektur der Publikation

Anteil Susan Kralisch (Autor 3):

- Lesen und Korrektur der Publikation

Anteil Michael Stumvoll (Autor 4):

- Lesen und Korrektur der Publikation

Anteil Mathias Faßhauer (Letztautor):

- Projektidee
- Konzeption
- Drittmittelwerbung
- Statistische Bearbeitung
- Schreiben und Endkorrektur der Publikation

Titel: The adipokine preadipocyte factor-1 is downregulated in preeclampsia and expressed in placenta

Journal: Cytokine 75 (2015); 338–343

Autoren: Schrey S, Wurst U (gleichberechtigter Zweitautor), Ebert T, Kralisch S, Drewlo S, Stepan H, Lössner U, Platz M, Kratzsch J, Stumvoll M, Fasshauer M.

Anteil Susanne Schrey:

- Konzeption
- Projektidee
- Patientenrekrutierung
- Aufbereitung Plazentagewebe
- Lesen und Korrektur der Publikation

Anteil Ulrike Wurst (gleichberechtigter Zweitautor):

- Patientenrekrutierung
- Statistische Erfassung
- Medizinische Dokumentation
- Analyse und Verarbeitung der Daten
- Schreiben und Endkorrektur der Publikation

Anteil Thomas Ebert (Autor 3):

- Patientenrekrutierung
- Medizinische Dokumentation
- Schreiben und Korrektur der Publikation

Anteil Susan Kralisch (Autor 4):

- Lesen und Korrektur der Publikation

Anteil Sascha Drewlo (Autor 5):

- Aufbereitung Plazentagewebe
- Lesen und Korrektur der Publikation

Anteil Holger Stepan (Autor 6):

- Lesen und Korrektur der Publikation

Anteil Ulrike Lössner (Autor 7):

- ELISA-Messungen

Anteil Martin Platz (Autor 8):

- Patientenrekrutierung

Anteil Jürgen Kratzsch (Autor 9):

- Durchführung der Messung von Standardlaborparametern

Anteil Michael Stumvoll (Autor 10):

- Lesen und Korrektur der Publikation

Anteil Mathias Faßhauer (Letztautor):

- Projektidee
- Konzeption
- Drittmiteleinwerbung
- Statistische Bearbeitung
- Schreiben und Endkorrektur der Publikation

5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Die Regulation von *Preadipocyte factor-1* bei Gestationsdiabetes mellitus und Präeklampsie

Eingereicht von: Ulrike Wurst, geb. 12.05.1990 in Schmalkalden

Angefertigt an der: Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie,
Universitätsklinikum Leipzig, Universität Leipzig

Betreut von: Prof. Dr. med. habil. Mathias Faßhauer

Eingereicht im: März 2016

Adipositas stellt ein zentrales Thema der heutigen Gesellschaft dar. Vor allem die mit Übergewicht assoziierten Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Hypertonie zeugen von zunehmender klinischer Relevanz des Krankheitsbildes in der Medizin. Somit rückte die Problematik auch in den Fokus der Forschung. In den letzten Jahren etablierte sich das Fettgewebe als ein Organ, welches neben seiner Energiespeicherfunktion auch Botenstoffe produziert und in den menschlichen Kreislauf entlässt. Diese von Fettzellen sezernierten Proteohormone werden Adipokine genannt. Adipokine wirken als Mediatoren direkt oder indirekt auf den Zucker- und Lipidstoffwechsel, die Blutdruckregulation und Entzündungsprozesse im Körper ein. Somit stellen Adipokine ein Verbindungsglied zwischen Adipositas und den langfristig damit verbundenen Folgeerkrankungen dar.

Auch in der Schwangerschaft spielen Adipositas und die damit assoziierten Komplikationen eine wichtige Rolle. Stimmt hier das Gleichgewicht beispielsweise zwischen pro- und anti-inflammatorischen sowie pro- und anti-angiogenen Faktoren nicht, drohen erhebliche Schwangerschaftskomplikationen, welche eine Gefahr für Mutter und Kind darstellen. Gestationsdiabetes mellitus (GDM) und Präeklampsie (PE) sind zwei schwere metabolische und vaskuläre Schwangerschaftskomplikationen, die erhebliche Auswirkungen auf den mütterlichen und kindlichen Stoffwechsel haben. Die Regulation einiger Adipokine wie Leptin, Adiponectin und Resistin bei GDM und PE wurde bereits in früheren Studien ausführlich beleuchtet. Zum Beginn der Dissertation lagen jedoch nur unzureichende Daten zur Regulation des neuen Adipokins *Preadipocyte factor-1* (Pref-1) bei diesen Schwangerschaftskomplikationen vor.

Pref-1 wird als Adipokin vorrangig von Fettvorläuferzellen produziert und wirkt sich inhibitorisch auf die Adipogenese aus. Demnach gehen hohe Pref-1 Konzentrationen mit einer verminderten Fettmasse einher. Zudem wurden im Tiermodell für Pref-1 neben den anti-adipogenen Wirkungen auch Insulinresistenz-fördernde Eigenschaften beschrieben. Klinische Untersuchungen zeigen folgerichtig eine positive Korrelation von Pref-1 mit erhöhten Blutfettwerten, erhöhtem Blutzucker sowie Insulinresistenz. Auch auf das Immunsystem nimmt Pref-1 Einfluss. Es fördert die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine sowie die Proliferation von Immunzellen und kann so verstärkend auf Inflamationsprozesse wirken. Des Weiteren wirkt Pref-1 auf die Gefäßdifferenzierung. Durch sein anti-angiogenes Potentials führt es zu verminderter Gefäßneubildung und verzögerter Wundheilung.

Die vorliegende Arbeit untersuchte nun erstmals die Regulation von Pref-1 in der maternalen Zirkulation bei GDM und PE in drei unterschiedlichen Studienkohorten. In Studienpopulation 1 (GDM) wurde die Regulation des Adipokins bei 74 schwangeren Frauen mit GDM sowie 74 gesunden Alter-, BMI- und Gestationsalter-gematchten Schwangeren untersucht. In Studienpopulation 2 (PE) wurde Pref-1 bei 51 Patientinnen mit PE und 51 gesunden Alter-gematchten Schwangeren gemessen. Zusätzlich wurde hier in einer Subpopulation die maternale Pref-1 Konzentration 6 Monate postpartal untersucht. In einer dritten Studienpopulation (peripartaler Zeitraum) wurden Pref-1 Serumkonzentrationen bei 40 gesunden Schwangeren innerhalb von 24 h vor und nach elektiver Sectio bestimmt. Außerdem wurden in dieser Population von jeder Probandin Plazentagewebeproben gewonnen und auf Pref-1 Proteinsynthese untersucht.

Ausgehend von der Annahme, dass es einen Zusammenhang in der Regulation von Insulinresistenz-induzierendem, anti-adipogenem, proinflammatorischem und anti-angiogenem Pref-1 und den vorliegenden Schwangerschaftskomplikationen gibt, wurden folgende Hypothesen geprüft:

- 1) Pref-1 Konzentrationen sind bei den Schwangerschaftskomplikationen GDM und PE im Vergleich zu gesunden Schwangeren erhöht.
- 2) Die Plazenta trägt durch Expression von Pref-1 zur Regulation des Adipokins in der Schwangerschaft bei.

In Studienpopulation 1 (GDM) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Pref-1 Serumkonzentrationen zwischen den beiden Gruppen. Es konnte eine positive Korrelation von Pref-1 mit dem Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie Parametern des Lipidstoffwechsels und der Nierenfunktion gezeigt werden. Diese blieben auch in der linearen

Regressionsanalyse als positive und unabhängige Prädiktoren bestehen. Eine unabhängige negative Assoziation konnte hingegen mit BMI und C reaktivem Protein gezeigt werden. Keine Korrelation zeigte sich zwischen Pref-1-Konzentrationen und Markern des Glucosestoffwechsels.

In Studienpopulation 2 (PE) waren die Serumkonzentrationen von Pref-1 signifikant geringer in Schwangeren mit PE verglichen zu Kontrollen. In der Längsschnittuntersuchung war dieser Unterschied 6 Monate postpartal nicht mehr nachweisbar. Allerdings konnte ein signifikanter Abfall der Serumkonzentrationen 6 Monate nach Entbindung im Vergleich zu Werten während der Schwangerschaft gezeigt werden. Auch in Studienpopulation 2 korrelierte Pref-1 positiv und unabhängig mit dem Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Zusätzlich waren in der multivariaten Regressionsanalyse PE und Leptin unabhängige Prädiktoren für zirkulierendes Pref-1 während der Schwangerschaft.

In Studienpopulation 3 (peripartaler Zeitraum) fielen die Pref-1-Serumkonzentrationen signifikant von prä- zu postpartal ab. In den immunhistochemischen Untersuchungen der Plazentagewebeproben wurde eine deutliche Expression in den Synzytiotrophoblasten und Endothelzellen nachgewiesen.

Zusammenfassend ist maternales zirkulierendes Pref-1 – entgegen der ursprünglichen Hypothese 1 – nicht verändert bei GDM sowie vermindert bei Schwangeren mit PE. Des Weiteren ist das Adipokin positiv mit der Schwangerschaftsdauer korreliert. Interessanterweise fallen die Konzentrationen von Pref-1 bereits kurz nach der Entbindung ab. Daher lässt sich – in Übereinstimmung mit Hypothese 2 – die Plazenta als beitragendes Organ zu den Serumkonzentrationen vermuten. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Plazentagewebe untermauern diese Hypothese zusätzlich. Ob Pref-1 eine pathophysiologische Rolle in der Entstehung der Schwangerschaftskomplikationen GDM und PE spielt, muss jedoch noch in weiterführenden Studien untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Datenreport - Statistisches Bundesamt (Destatis) n.d.
- [2] Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of childhood and adult obesity in the united states, 2011-2012. *JAMA* 2014;311:806–14.
- [3] Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968–77.
- [4] Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med* 2015.
- [5] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548–56.
- [6] Grundy SM. Adipose tissue and metabolic syndrome: too much, too little or neither. *Eur J Clin Invest* 2015;45:1209–17.
- [7] Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C, Participants for the C. Definition of Metabolic Syndrome Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 2004;109:433–8.
- [8] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425–32.
- [9] Park H-K, Ahima RS. Leptin signaling. *F1000Prime Rep* 2014;6.
- [10] Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413–37.
- [11] Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, Kaklamani V, Liolios A, Doulgerakis DE, et al. Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3408–13.
- [12] Leal V de O, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta* 2013;419:87–94.
- [13] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *CircRes* 2005;96:939–49.
- [14] Mattu HS, Randeve HS. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol* 2013;216:T17–T36.
- [15] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *JBiolChem* 1995;270:26746–9.
- [16] Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *JBiolChem* 1996;271:10697–703.
- [17] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79–83.

- [18] Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:85–97.
- [19] Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226–8.
- [20] Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF- κ B activation and IL-6 production and increases PPAR γ 2 expression in adipocytes. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1220–R1225.
- [21] Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, et al. Adiponectin Specifically Increased Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Through Interleukin-10 Expression in Human Macrophages. *Circulation* 2004;109:2046–9.
- [22] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473–6.
- [23] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000;102:1296–301.
- [24] Shibata R, Ouchi N, Murohara T. Adiponectin and Cardiovascular Disease. *Circ J* 2009;73:608–14.
- [25] McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, et al. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2407.
- [26] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307–12.
- [27] Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005;174:5789–95.
- [28] Steppan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:18–23.
- [29] Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, et al. Chemerin, a Novel Adipokine That Regulates Adipogenesis and Adipocyte Metabolism. *J Biol Chem* 2007;282:28175–88.
- [30] Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 2003;198:977–85.
- [31] Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, Ziegler F von, et al. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *Eur J Endocrinol* 2009;161:339–44.
- [32] Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, et al. Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Endocrinology* 2007;148:4687–94.

- [33] Kleinwechter H, Demandt N, Schäfer-Graf U. Prädisposition und Phänotypen des Gestationsdiabetes. *DMW - Dtsch Med Wochenschr* 2014;139:1123–6.
- [34] Huy C, Loerbroks A, Hornemann A, Röhrig S, Schneider S. Prevalence, Trend and Determining Factors of Gestational Diabetes in Germany. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2012;72:311–5.
- [35] Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R. What is gestational diabetes? *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S105–S111.
- [36] Jovanovic L, Pettitt DJ. Gestational diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286:2516–8.
- [37] Landon MB, Gabbe SG. Gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 2011;118:1379–93.
- [38] Harreiter J, Doyjak G, Kautzky-Willer A. Gestational diabetes mellitus and cardiovascular risk after pregnancy. *Womens Health* 2013;10:91–108.
- [39] Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *The Lancet* 2005;365:785–99.
- [40] Stepan H, Geide A, Faber R. Soluble fms-like Tyrosine Kinase 1. *N Engl J Med* 2004;351:2241–2.
- [41] Stepan H, Faber R. Elevated sFlt1 Level and Preeclampsia with Parvovirus-Induced Hydrops. *N Engl J Med* 2006;354:1857–8.
- [42] Stepan H, Walther T. Questionable Role of the Angiotensin II Receptor Subtype 1 Autoantibody in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Hypertension* 2007;50:e3–e3.
- [43] Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. Predictive Value of Maternal Angiogenic Factors in Second Trimester Pregnancies With Abnormal Uterine Perfusion. *Hypertension* 2007;49:818–24.
- [44] Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *The Lancet* 21;376:631–44.
- [45] Redman CWG, Sargent IL, Roberts JM. Chapter 8 - Immunology of Normal Pregnancy and Preeclampsia. In: Cunningham MDLMRG, editor. *Chesleys Hypertens. Disord. Pregnancy* Third Ed., San Diego: Academic Press; 2009, p. 129–42.
- [46] Redman CWG, Sargent IL. Placental Stress and Pre-eclampsia: A Revised View. *Placenta* 2009;30, Supplement:38–42.
- [47] Myers J, Mires G, Macleod M, Baker P. In Preeclampsia, the Circulating Factors Capable of Altering In Vitro Endothelial Function Precede Clinical Disease. *Hypertension* 2005;45:258–63.
- [48] Lobner K, Knopff A, Baumgarten A, Mollenhauer U, Marienfeld S, Garrido-Franco M, et al. Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 2006;55:792–7.
- [49] Feig DS, Shah BR, Lipscombe LL, Wu CF, Ray JG, Lowe J, et al. Preeclampsia as a Risk Factor for Diabetes: A Population-Based Cohort Study. *PLoS Med* 2013;10:e1001425.

- [50] Ramsay JE, Stewart F, Greer IA, Sattar N. Microvascular dysfunction: a link between pre-eclampsia and maternal coronary heart disease. *BJOG* 2003;110:1029–31.
- [51] Santangeli L, Sattar N, Huda SS. Impact of Maternal Obesity on Perinatal and Childhood Outcomes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015;29:438–48.
- [52] Triunfo S, Lanzone A. Impact of overweight and obesity on obstetric outcomes. *J Endocrinol Invest* 2014;37:323–9.
- [53] Kampmann U, Madsen LR, Skajaa GO, Iversen DS, Moeller N, Ovesen P. Gestational diabetes: A clinical update. *World J Diabetes* 2015;6:1065–72.
- [54] Spradley FT, Palei AC, Granger JP. Immune Mechanisms Linking Obesity and Preeclampsia. *Biomolecules* 2015;5:3142–76.
- [55] Schubring C, Englaro P, Siebler T, Blum WF, Demirakca T, Kratzsch J, et al. Longitudinal analysis of maternal serum leptin levels during pregnancy, at birth and up to six weeks after birth: relation to body mass index, skinfolds, sex steroids and umbilical cord blood leptin levels. *HormRes* 1998;50:276–83.
- [56] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *NatMed* 1997;3:1029–33.
- [57] Chen D, Xia G, Xu P, Dong M. Peripartum serum leptin and soluble leptin receptor levels in women with gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010;89:1595–9.
- [58] Qiu C, Williams MA, Vadachkoria S, Frederick IO, Luthy DA. Increased Maternal Plasma Leptin in Early Pregnancy and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol* 2004;103:519–25.
- [59] Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S112–S119.
- [60] D’Anna R, Baviera G, Cannata ML, De Vivo A, Di Benedetto A, Corrado F. Midtrimester amniotic fluid leptin and insulin levels and subsequent gestational diabetes. *GynecolObstetInvest* 2007;64:65–8.
- [61] Challier J, Galtier M, Bintein T, Cortez A, Lepercq J, Hauguel-De Mouzon S. Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 2003;24:92–9.
- [62] Haugen F, Ranheim T, Harsem NK, Lips E, Staff AC, Drevon CA. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *AmJPhysiol EndocrinolMetab* 2006;290:E326–E333.
- [63] Ning Y, Williams MA, Muy-Rivera M, Leisenring WM, Luthy DA. Relationship of maternal plasma leptin and risk of pre-eclampsia: a prospective study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;15:186–92.
- [64] Moore LE, Wallace KL, Alexander BT, May WL, Thigpen BD, Bennett WA. Reduced placental perfusion causes an increase in maternal serum leptin. *Placenta* 2003;24:877–81.

- [65] Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, et al. Augmented Placental Production of Leptin in Preeclampsia: Possible Involvement of Placental Hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3225–9.
- [66] Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy. *AmJObstetGynecol* 2006;194:1537–45.
- [67] Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, Bernard S, Kalhan S, et al. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 2006;49:1677–85.
- [68] Kajantie E, Hytinen T, Hovi P, Andersson S. Cord plasma adiponectin: a 20-fold rise between 24 weeks gestation and term. *JClinEndocrinolMetab* 2004;89:4031–6.
- [69] Altinova AE, Toruner F, Bozkurt N, Bukan N, Karakoc A, Yetkin I, et al. Circulating concentrations of adiponectin and tumor necrosis factor- α in gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:161–5.
- [70] Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW, et al. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* 2006;49:1292–302.
- [71] Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, et al. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:447–53.
- [72] Lain KY, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. First trimester adipocytokine concentrations and risk of developing gestational diabetes later in pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:407–11.
- [73] Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *BiochemBiophysResCommun* 2002;290:1084–9.
- [74] Ramsay JE, Jamieson N, Greer IA, Sattar N. Paradoxical elevation in adiponectin concentrations in women with preeclampsia. *Hypertension* 2003;42:891–4.
- [75] Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, et al. Resistin is expressed in the human placenta. *JClinEndocrinolMetab* 2003;88:1394–7.
- [76] Kuzmicki M, Telejko B, Szamatowicz J, Zonenberg A, Nikolajuk A, Kretowski A, et al. High resistin and interleukin-6 levels are associated with gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:258–63.
- [77] Megia A, Vendrell J, Gutierrez C, Sabaté M, Broch M, Fernández-Real J-M, et al. Insulin sensitivity and resistin levels in gestational diabetes mellitus and after parturition. *Eur J Endocrinol* 2008;158:173–8.
- [78] Kielstein JT, Becker B, Graf S, Brabant G, Haller H, Fliser D. Increased resistin blood levels are not associated with insulin resistance in patients with renal disease. *AmJKidney Dis* 2003;42:62–6.

- [79] Garces MF, Sanchez E, Ruíz-Parra AI, Rubio-Romero JA, Angel-Müller E, Suarez MA, et al. Serum chemerin levels during normal human pregnancy. *Peptides* 2013;42:138–43.
- [80] Kasher-Meron M, Mazaki-Tovi S, Barhod E, Hemi R, Haas J, Gat I, et al. Chemerin concentrations in maternal and fetal compartments: implications for metabolic adaptations to normal human pregnancy. *J Perinat Med* 2013;42:371–8.
- [81] Barker G, Lim R, Rice GE, Lappas M. Increased chemerin concentrations in fetuses of obese mothers and correlation with maternal insulin sensitivity. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet* 2012;25:2274–80.
- [82] Van Poppel MNM, Zeck W, Ulrich D, Schest E-C, Hirschmugl B, Lang U, et al. Cord blood chemerin: differential effects of gestational diabetes mellitus and maternal obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013:n/a–n/a.
- [83] Pfau D, Stepan H, Kratzsch J, Verlohren M, Verlohren H-J, Drynda K, et al. Circulating Levels of the Adipokine Chemerin in Gestational Diabetes Mellitus. *Horm Res Paediatr* 2010;74:56–61.
- [84] Stepan H, Philipp A, Roth I, Kralisch S, Jank A, Schaarschmidt W, et al. Serum levels of the adipokine chemerin are increased in preeclampsia during and 6 months after pregnancy. *Regul Pept* 2011;168:69–72.
- [85] Duan D-M, Niu J-M, Lei Q, Lin X-H, Chen X. Serum levels of the adipokine chemerin in preeclampsia. *J Perinat Med* 2011;40:121–7.
- [86] Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 1993;73:725–34.
- [87] Wang Y, Zhao L, Smas C, Sul HS. Pref-1 Interacts with Fibronectin To Inhibit Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol* 2010;30:3480–92.
- [88] Wang Y, Sul HS. Pref-1 Regulates Mesenchymal Cell Commitment and Differentiation through Sox9. *Cell Metab* 2009;9:287–302.
- [89] Hudak CS, Sul HS. Pref-1, a Gatekeeper of Adipogenesis. *Front Endocrinol* 2013;4.
- [90] Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim K-H, Yun EJ, et al. Mice Lacking Paternally Expressed Pref-1/Dlk1 Display Growth Retardation and Accelerated Adiposity. *Mol Cell Biol* 2002;22:5585–92.
- [91] Villena JA, Choi CS, Wang Y, Kim S, Hwang Y-J, Kim Y-B, et al. Resistance to High-Fat Diet-Induced Obesity but Exacerbated Insulin Resistance in Mice Overexpressing Preadipocyte Factor-1 (Pref-1) A New Model of Partial Lipodystrophy. *Diabetes* 2008;57:3258–66.
- [92] O'Connell J, Lynch L, Hogan A, Cawood TJ, O'Shea D. Preadipocyte Factor-1 Is Associated with Metabolic Profile in Severe Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E680–E684.

- [93] Kavalkova P, Touskova V, Roubicek T, Trachta P, Urbanova M, Drapalova J, et al. Serum Preadipocyte Factor-1 Concentrations in Females with Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: The Influence of Very Low Calorie Diet, Acute Hyperinsulinemia, and Fenofibrate Treatment. *Horm Metab Res* 2013;45:820–6.
- [94] Lee K, Villena JA, Moon YS, Kim K-H, Lee S, Kang C, et al. Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest* 2003;111:453–61.
- [95] Chacón MR, Miranda M, Jensen CH, Fernández-Real JM, Vilarrasa N, Gutiérrez C, et al. Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *Int J Obes* 2008;32:1122–9.
- [96] Abdallah BM, Boissy P, Tan Q, Dahlgaard J, Traustadottir GA, Kupisiewicz K, et al. dlk1/FA1 Regulates the Function of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Modulating Gene Expression of Pro-inflammatory Cytokines and Immune Response-related Factors. *J Biol Chem* 2007;282:7339–51.
- [97] Rodríguez P, Higuera MA, González-Rajal A, Alfranca A, Fierro-Fernández M, García-Fernández RA, et al. The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2012;93:232–41.
- [98] American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2016;39:S13–S22.
- [99] National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:S1–S22.
- [100] Drewlo S, Czikk M, Baczyk D, Lye S, Kingdom J. Glial cell missing-1 mediates over-expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in severe pre-eclamptic placental villi. *Hum Reprod* 2011;26:1025–34.

A. Abkürzungsverzeichnis

BMI	<i>body mass index</i>
CRP	C reactives Protein
ELISA.....	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
GDM.....	Gestationsdiabetes mellitus
IL-6.....	<i>interleukin-6</i>
PE	Präeklampsie
Pref-1	<i>Preadipocyte factor-1</i>
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TG.....	Triglyzeride
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>

B. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

C. Erklärung über die Vorbehaltlichkeit der Verfahrenseröffnung zur Verleihung des Titels Dr. med

Der erfolgreiche Abschluss des letzten Staatsexamens oder die Approbation zum Arzt ist Voraussetzung für den Abschluss des Promotionsverfahrens und damit der Verleihung des akademischen Grades. Die Zulassung zum Promotionsverfahren ist insoweit nur vorläufig und steht unter der auflösenden Bedingung des Nichtbestehens des letzten Staatsexamens oder der Approbation zum Arzt. Dieser Abschluss ersetzt nach Regelung im § 12 der Promotionsordnung das Rigorosum. Das Rigorosum ist essentieller Bestandteil und notwendig zum erfolgreichen Abschluss des Promotionsverfahrens. Entsprechend den Regelungen in § 12 wird das eröffnete Promotionsverfahren bei Nichtbeendigung des Studiums durch die Promotionskommission ohne Titelvergabe eingestellt.

Hiermit erkläre ich, dass mir dieser Sachverhalt im Rahmen der Eröffnung meines Promotionsverfahrens bekannt ist und ich im Falle des Fehlens der Voraussetzung des Abschlusses meines Promotionsverfahrens keine rechtlichen Ansprüche an eine Vergabe eines akademischen Grades oder Titels stelle.

.....

Datum

.....

Unterschrift

D. Wissenschaftlicher Lebenslauf

Ulrike Wurst

Geboren am 12.05.1990 in Schmalkalden

Ausbildung:

- 06/2008 Abitur am Staatlichen Gymnasium Suhl
- 10/2009 Beginn Studium Humanmedizin an der Universität Leipzig
- 09/2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 10/2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

- 2012 Innere Medizin, Fachbereich Endokrinologie, Universitätsklinikum Leipzig
- 2013 Allgemeinmedizin, Hausarztpraxis Dr. Gabriel-Müller, Leipzig
- 2013 Internistische Notfallaufnahme, Städtisches Klinikum St. Georg, Leipzig
- 2014 Pädiatrie, Fachbereich Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Leipzig
- 2015 Neurologie, SRH Zentralklinikum Suhl

Wissenschaftlicher Werdegang:

- 04-11/2013 Forschungsstipendium zum Thema „Die Adipokine Progranulin, Resistin und Lipocalin-2 in Patientinnen mit Gestationsdiabetes mellitus und Präeklampsie“ im Rahmen der MD Pro_1-Förderung des IFB AdipositasErkrankungen der Universität Leipzig
- 04-09/2014 Forschungsstipendium zum Thema „Die Adipokine Betatrophin und C1q/TNF-related Protein-12 bei Patientinnen mit Gestationsdiabetes mellitus und Präeklampsie“ im Rahmen der MD Pro_2-Förderung des IFB AdipositasErkrankungen der Universität Leipzig

Wissenschaftliche Publikationen:

Ebert T, Kralisch S, Wurst U, Scholz M, Stumvoll M, Kovacs P, Fasshauer M, Tönjes A (2015). Association of metabolic parameters and rs726344 in FNDC5 with serum irisin concentrations. *Int J Obes*. [Epub ahead of print]

Schrey S*, Wurst U (equally contributing)*, Ebert T, Kralisch S, Drewlo S, Stepan H, Lössner U, Platz M, Kratzsch J, Stumvoll M, Fasshauer M (2015). The adipokine preadipocyte factor-1 is downregulated in preeclampsia and expressed in placenta. *Cytokine*. 75(2):338-43.

Ebert T, Kralisch S, Wurst U, Lössner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M, Tönjes A, Fasshauer M (2015). Betatrophin levels are increased in women with gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *Eur J Endocrinol*. 173(1):1-7.

Platz M, Stepan H, Schrey S, Kralisch S, Wurst U, Lössner U, Jessnitzer B, Kratzsch J, Stumvoll M, Fasshauer M, Ebert T (2015). Serum levels of sclerostin in cardiometabolic disorders during pregnancy. *Cytokine*. 76(2):591-3.

Wurst U, Ebert T, Kralisch S, Stumvoll M, Fasshauer M (2015). Serum levels of the adipokine Pref-1 in gestational diabetes mellitus. *Cytokine*. 71(2):161-4.

Karger S, Wiesner T, Kersting A, Braun M, Ebert T, Wurst U, Kratzsch J, Stumvoll M, Fasshauer M (2014). Increased chromogranin a and carcinoid syndrome-like symptoms in a patient treated with duloxetine. *Endocr Pract*. 20(11):e215-8.

Ebert T, Hopf LM, Wurst U, Bachmann A, Kralisch S, Lössner U, Platz M, Kratzsch J, Stolzenburg JU, Dietel A, Grisk O, Beige J, Anders M, Bast I, Klötting N, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M (2014). Circulating adipocyte fatty acid binding protein is increased in chronic and acute renal dysfunction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 24(9):1027-34.

Ebert T, Focke D, Petroff D, Wurst U, Richter J, Bachmann A, Lössner U, Kralisch S, Kratzsch J, Beige J, Bast I, Anders M, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M (2014). Serum levels of the myokine irisin in relation to metabolic and renal function. *Eur J Endocrinol*. 170(4):501-6.

Wissenschaftliche Vorträge:

05/2014 Vortrag im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft zum Thema „The adipokine preadipocyte factor-1 is downregulated in preeclampsia and expressed in placenta“

E. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich über den Zeitraum der Promotion unterstützt, begleitet und bereichert haben.

An erster Stelle danke ich dabei meinem Betreuer, Prof. Dr. med. Mathias Faßhauer. Vielen Dank für die aufmerksame und gewissenhafte Betreuung, die ich während dieser gesamten Zeit erfahren durfte. Seine geduldige Art und ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft haben mich vom ersten Treffen an beeindruckt.

Ein großer Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe Faßhauer, die mich von Anfang an herzlich aufgenommen haben. Besonders danke ich hierbei Frau Dr. Susan Kralisch und Dr. Thomas Ebert, die stets Motivation, Geduld und ein offenes Ohr für meine vielen Fragen hatten. Danke auch an Frau Ulrike Löbner und Frau Beate Jessnitzer, für die Unterstützung und geduldige Einweisung in die Laborarbeit.

Vielen Dank allen Studienteilnehmerinnen und den beteiligten Kliniken für die Möglichkeit der Patientenrekrutierung.

Dem IFB AdipositasErkrankungen Leipzig danke ich für die tolle Unterstützung im Rahmen der Promotionsförderungsprogramme MD Pro_1 und MD Pro_2.

Ein weiterer Dank geht an meinen Korrekturleser, Sebastian Klose, vor allem für die Nachhilfe in Kommasetzung.

Meinen Eltern Carsten und Uta Wurst danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Motivation, die mich schon durch mein gesamtes Studium und bisheriges Leben begleiten. Danke auch an meine Schwester Catherina, dafür dass sie mir in den großen und kleinen Problemen des Alltags stets beiseite steht.